

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

**Beeinflussung der Vermehrungskinetik ausgewählter Krankheitserreger durch
Antiseptika und Tissue Tolerable Plasma (TTP)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald

2014

vorgelegt von: Farzana Rebert
geboren am: 12.11.1978
in: Kabul

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Kramer

2. Gutachter: Prof. Dr. T. v. Woedtke

3. Gutachter: Prof. Dr. C. Herr

Tag der Disputation: 28.04.2014

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum des FLI für Mikrobiologie

Abkürzungsverzeichnis

α	Signifikanzniveau
Abb.	Abbildung
AUC	Area under the curve
B	Belgien
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CH	Schweiz
CHX	Chlorhexidin
CSA	Casein-Soja-Pepton-Agar
CSL	Casein-Soja-Pepton-Lösung
d	Tag
D	Deutschland
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
exp.	experimentell
F	Frankreich
FE-DBD	Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge
h	Stunde
HDBD	Hohlelektroden-Dielectric-Barrier Discharge
HH	Hirn-Herz-Glucose-Boullion
HH-A	Hirn-Herz-Glucose-Agar
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Viren
Hrsg.	Herausgeber
KbE	Koloniebildende Einheit
min	Minute
MRSA	<i>Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-sensitiver Staphylococcus aureus</i>
MTP	Mikrotiterplatte
OCT	Octenidin
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzwert
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PHMB	Polyhexamethylenbiguanid
PVP-Iod	Polyvinylpyrrolidon-Iod
s	Sekunde

SBD	Surface Dielectric Barrier Discharge
SD	Standardabweichung
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SG-A	Sabouraud-4%-Glucose-Agar
slm	Standardliter/Minute
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
spp.	species pluralis
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
Tab.	Tabelle
TTP	Tissue Tolerable Plasma
VDBD	Volume Dielectric Barrier Discharge
\bar{x}	Mittelwert
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Einführung und Zielstellung	1
1.2 Einsatz von Antiseptika in der Medizin	3
1.2.1 Chlorhexidindigluconat (Chlorhexidin/CHX)	3
1.2.2 Polyhexamethylenbiguanid (Polihexanid/PHMB)	4
1.2.3 Octenidindihydrochlorid (Octenidin/OCT)	5
1.3 Einsatz von physikalischem Plasma in der Medizin	6
1.3.1 Anwendung von Plasma zur Wundbehandlung	7
1.3.2 Eigenschaften der verwendeten Erreger	8
1.3.3 Nosokomiale Bedeutung der Biofilmbildung	12
2 Eigene Untersuchungen	14
2.1 Methoden	14
2.1.1 Materialien	14
2.1.2 Herstellung der Subkulturen und Erregersuspensionen	16
2.1.3 Analyseverfahren	17
2.1.4 Durchführung der Versuche	18
2.1.4.1 Exposition mit Antiseptika bzw. mit Plasma	20
2.2 Ergebnisse	24
2.2.1 Vorversuche	24
2.2.1.1 Korrelation der Vermehrungskurven bestimmt mittels OD bzw. KbE	24
2.2.1.2 Korrelation von OD und KbE bei unterschiedlichen Wellenlängen	24
2.2.1.3 Korrelation unterschiedlicher Verdünnungsstufen der KbE/ml mit der OD und dem Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase	25
2.2.2 Hauptversuche	26
2.2.2.1 <i>C. albicans</i> ATCC 10231	27
2.2.2.2 <i>C. albicans</i> SC 5314	32
2.2.2.3 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	38
2.2.2.4 <i>P. aeruginosa</i> SG 81	41
2.2.2.5 <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	45
2.2.2.6 <i>S. epidermidis</i> RP 62A	47
2.2.2.7 <i>S. mutans</i> DSM 20523	51
2.2.2.8 <i>S. sanguinis</i> DSM 20068	57
3 Diskussion	60
3.1 Methodische Gesichtspunkte der Vorversuche	61
3.2 Ergebnisse der Hauptversuche	62

3.2.1	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 und SC 5314	62
3.2.2	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 und SG 81	64
3.2.3	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 und RP 62A	66
3.2.4	<i>S. mutans</i> DMS 20532	68
3.2.5	<i>S. sanguinis</i> DSM 20068	69
3.2.6	Schlussfolgerung	70
3.2.7	Fehlerbetrachtung	71
4	Zusammenfassung	72
5	Summary	74
6	Literaturverzeichnis	76
	Eidesstattliche Erklärung	86
	Danksagung	87

1 Einleitung

1.1 Einführung und Zielstellung

Kontinuitätsunterbrechungen der Haut im Sinne von Wunden und deren Gefährdung durch Infektionen sind bekannt, so lange die Menschheit existiert. Dennoch wurde erst in den fünfziger Jahren des neunzehnten Jahrhunderts durch Louis Pasteur der Zusammenhang zwischen Infektion, Krankheitssymptomen und dem Auftreten von Mikroorganismen beschrieben. Damit wurde der Weg zur gezielten Bekämpfung und Prävention von Infektionskrankheiten geebnet. Vorreiter in der Umsetzung der Erkenntnisse des sich damals neu entwickelnden Faches der Hygiene in Hinsicht auf aseptisches Arbeiten zur Vermeidung lebensgefährlicher Wundinfektionen waren die Chirurgie und die Geburtshilfe. Diese Fächer hatten einen herausragenden Anteil an der Etablierung der Antisepsis, der Eliminierung von in die Wunde gelangten Infektionserregern und der Asepsis (Eckart 2001). Bis heute ist ohne Antisepsis und ohne Aufbereitung von Medizinprodukten kein diagnostisches und chirurgisches Vorgehen vertretbar.

Ein neuer in der Entwicklung befindlicher Zweig der Medizin ist die Plasmamedizin. Eine medizinische Anwendung von Plasma im Bereich der Hygiene eröffnen gewebekompatible Atmosphärendruckplasmen (Tissue Tolerable Plasma, TTP). Diese können unter anderem zur Dekontamination von Gewebeoberflächen und zur Zerstörung von sich dort entwickelnden Biofilmen (Kramer et al. 2010b) sowie unterstützend zur Stimulation der Heilung chronischer Wunden angewandt werden (Bender et al. 2012; Kramer et al. 2013a).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht im Vergleich der Wirksamkeit der Antiseptika Chlorhexidindigluconat, Polihexamethylenbiguanid und Octenidinhydrochlorid mit TTP anhand der Vermehrungshemmung bzw. Eradikation biofilmbildender Bakterien, untersucht bei *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. mutans* und *S. sanguinis* sowie der Hefe *C. albicans*, um daraus mögliche medizinische Anwendungsgebiete, insbesondere die antiseptische Behandlung von Wundinfektionen, ableiten zu können. Die Vermehrung von Mikroorganismen lässt sich bei regelmäßiger Zellzahlbestimmung logarithmisch oder wie in dieser Arbeit durchgeführt mittels Bestimmung der optischen Dichte abhängig von der Einwirkungszeit in ein Koordinatensystem eintragen und auswerten (Abb. 1). Häufig wird die Vermehrung von Bakterienzellen durch Zellteilung, also die Zunahme der Bakterienzahl, als bakterielles Wachstum bezeichnet und die dabei entstehenden Kurven als Wachstumskurven bezeichnet (Sahl 2001). Da es sich nicht um ein Wachstum der Bakterien, sondern um eine Vermehrung handelt, wird in

der vorliegenden Arbeit durchgehend die zutreffende Bezeichnung Vermehrung anstelle von Wachstum benutzt.

In einer statischen Bakterienkultur lassen sich vier Phasen unterscheiden. Die erste Phase ist die Anlauf- oder lag-Phase. In dieser passen sich die Mikroorganismen an das Medium an, nehmen an Größe zu und beginnen mit der Zellteilung. Die zweite oder log-Phase stellt die exponentielle Vermehrung der Mikroorganismen dar. Hier nimmt der Logarithmus der Zellzahl linear mit der Zeit zu. In der dritten oder stationären Phase kommt es zum Mangel an Nahrungskomponenten oder zum Auftreten von hemmenden Stoffwechselprodukten. Die Geschwindigkeit der Zellteilung nimmt ab, so dass ebenso viele Organismen absterben, wie durch Teilung entstehen. In der vierten und letzten Phase kommt es zur Abnahme der Zellzahl durch ein Überwiegen absterbender Organismen. Die zerfallenden Zellen bieten den lebenden Zellen neue Nährstoffe bis zu einem Gleichgewichtszustand, in dem nur noch wenige lebende Zellen vorhanden sind. In diesem Zustand kann die Kultur über Wochen und Monate verharren (Sahl 2001).

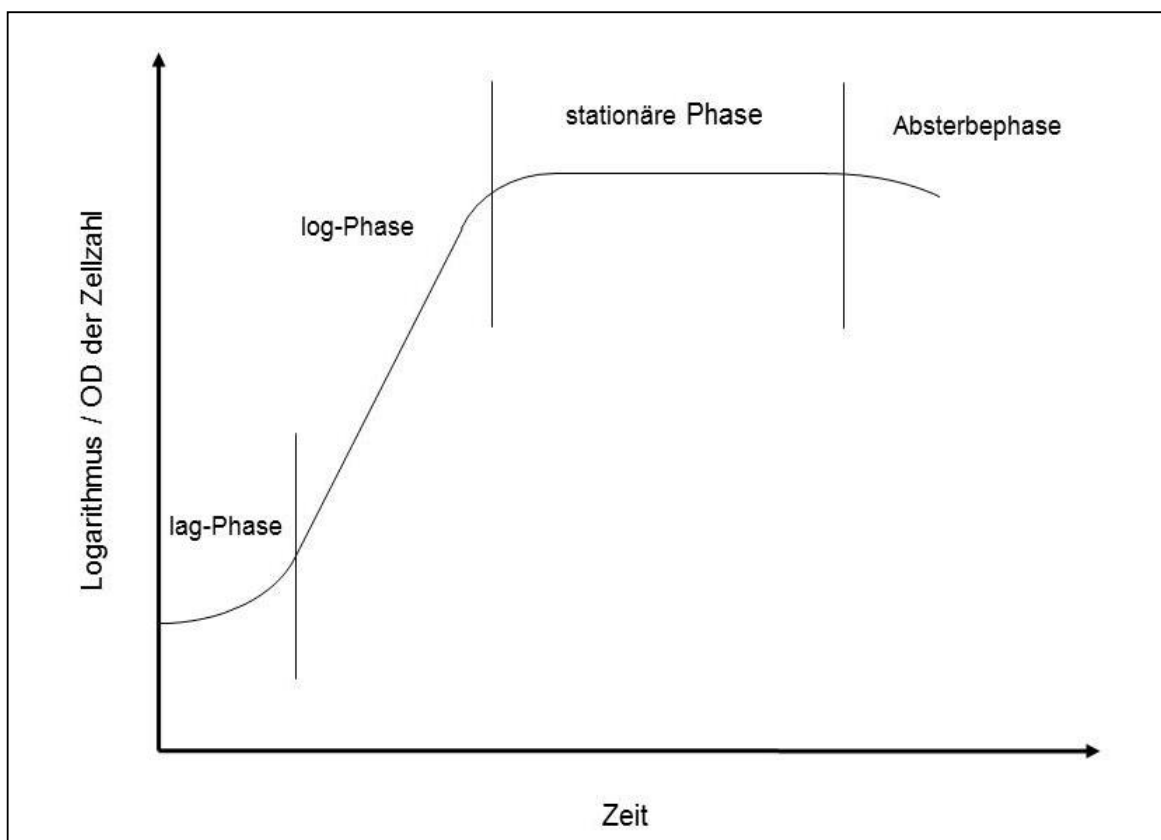


Abb. 1: Schematische Vermehrungskurve von Mikroorganismen

1.2 Einsatz von Antiseptika in der Medizin

In der Medizin lassen sich Antiseptika in unterschiedlichster Weise am menschlichen Körper mit dem Ziel anwenden, vermehrungsfähige Mikroorganismen und Viren abzutöten oder deren Vermehrung möglichst dauerhaft zu hemmen. Antiseptika können zu therapeutischen oder prophylaktischen Zwecken am Auge, in der Mundhöhle, im Genitalbereich, peritoneal, auf Wunden, Haut und Schleimhaut, im Rachenraum bis zu den unteren Atemwegen, in der Nase und an den Konjunktiven sowie im weiblichen und männlichen Urogenitaltrakt angewendet werden. Im Bereich der Wundantiseptik werden zusätzlich Verfahren angewandt, die biologisch z. B. in Form der Madentherapie (Daeschlein et al. 2007b), physikalisch z. B. mittels Wärmestrahlung (Hoffmann 2006) oder pulsierendem Gleichstrom (Daeschlein et al. 2007a), sowie dem in Erprobung befindlichen Atmosphärendruckplasma begründet sind (Kramer et al. 2008a).

Mikrobiell kontaminierte traumatische oder infizierte Wunden, die mit einer klinischen Symptomatik einhergehen, müssen umgehend präventiv oder therapeutisch antiseptisch behandelt werden. Die präventive Anwendung erfolgt mit der Zielsetzung, dass sich aus der Kontamination bzw. Kolonisation keine Infektion entwickelt, wodurch der Wundheilungsprozess verlangsamt bzw. unterbrochen wird. Eine Wundinfektion kann ohne Behandlung in eine Sepsis münden (Kramer et al. 2004). Zur Abschätzung der Infektionsgefährdung von Wunden wurde der Wound at Risk Score entwickelt, aus dem die Indikation für eine Wundantiseptik abgeleitet wird (Dissemond et al. 2011).

1.2.1 Chlorhexidindigluconat (Chlorhexidin/CHX)

CHX ist ein geruchloses, weißes, kristallines Pulver und ein Kation. Es hat einen Schmelzpunkt von 134 °C und ist in Alkohol, Glycerol, Polyethylenglycol und Propylenglycol leicht löslich. Im Wasser gelöst liegt es vor allem bei 20 °C zu 1,9 % als Chlorhexidindiacetat und nur zu 0,008 % als freie Base vor. Der Wirkort von CHX ist die negativ geladene Zellmembran, die in Abhängigkeit von der Mikroorganismenart, der Erregerdichte und des pH-Werts bei ausreichender Wirkstoffkonzentration zur Neutralisierung der Oberflächenladung der Zellmembran führt. Dabei nimmt mit steigendem pH-Wert die Wirkung und Adsorption an die Zellmembran zu. Niedrige Konzentrationen des Antiseptikums stimulieren die Dehydrogenaseaktivität der Zellen und lösen Bestandteile der Zellmembran heraus, höhere Konzentrationen lassen Membranbestandteile und Zellproteine koagulieren und führen zur Enzymhemmung (Kramer et al. 2008b).

Bei ca. 1 µg/ml hemmt CHX die Vermehrung der Bakterien, diese werden ab ≥ 20 µg/ml abgetötet. Vancomycin-resistente Enterokokken sind dagegen widerstandsfähig, wobei die mikrobiozide Wirkung auch bei MRSA deutlich schlechter ist als bei MSSA; es besteht nur eine schwache Wirksamkeit gegen Mykobakterien (Kramer et al. 2008b). Die Wirksamkeit von CHX ist im Gegensatz zu Octenidin, PVP-Iod und Benzalkoniumchlorid schwächer (Shimizu et al. 2002). Bei höheren Konzentrationen ist CHX wirksam gegen Pilze, wobei es notwendig sein kann, es mit anderen Wirkstoffen zu kombinieren, z. B. mit Parabenen, Chlorocresol oder 2-Phenoxyethanol. Die wiederholte Benutzung von CHX auf der Haut führt zu einer kumulativen antiseptischen Wirkung mit der Folge der Verringerung der Hautflora auf Grund der sogenannten remanenten Wirkung (Kramer et al. 2008b; Müller et al. 2014).

Die abtötende Wirkung gegen *S. aureus*, *E. faecium*, *P. aeruginosa* und *C. albicans* mit und ohne Belastung erfolgt in vitro innerhalb von 30 s, wobei der Wirkungseintritt bei Belastung in Kombination von 1 % Muzin und 4,5 % Albumin bei *P. aeruginosa* erst nach 1 min erfolgt (Kramer et al. 2008b).

CHX kann nur in Verbindung mit Hitze bei einer Konzentration von 0,01% eine sporozide Wirkung erzielen. Die Wirkung gegen HIV erfordert eine Einwirkzeit von 15 - 30 s, gegen HSV1/2 von 2 min. In vitro ist eine Resistenzentwicklung gegen verschiedene gramnegative Bakterien und MRSA nachgewiesen (Kramer et al. 2008b). CHX-basierte Zubereitungen können konzentrationsabhängig zur Wundheilungsverzögerung sowie zu anaphylaktischen und allergischen Reaktionen führen. Eingesetzt wird es vor allem in der Mundhöhlen- und Vaginalantiseptik sowie als Zusatz zu Alkohol basierten Hautantiseptika und Händedesinfektionsmitteln. Aufgrund effektiverer Alternativen wie z. B. Octenidin ist es in der Wundantiseptik in den Hintergrund getreten. Gebrauchseinschränkungen sind bekannt, z. B. bei Allergien, zur Peritonealspülung und zur Behandlung chronischer Wunden. Wegen bekannt gewordener neurotoxischer Nebenwirkungen darf es nicht am ZNS und im Innenohr angewendet werden (Kramer et al. 2008b).

1.2.2 Polyhexamethylenbiguanid (Polihexanid/PHMB)

PHMB ist geruchlos, in Lösung leicht gelblich schillernd oder farblos. Es ist ein Kation und gehört der Gruppe der Biguanide an. Um die Oberflächenspannung zu senken, wird es beispielsweise mit Polyethylenglycol 1 % kombiniert, um die Benetzung der Wundfläche zu verbessern. Die mikrobiozide Wirkung beruht auf der Wirkung gegenüber den sauren Lipiden der bakteriellen Zellmembran mit der Folge der

Permeabilitätsveränderung. Die menschliche Zellmembran wird aufgrund ihrer neutralen Lipide weniger angegriffen, was der Grund für die hohe therapeutische Breite ist (Kramer u. Roth 2008c). PHMB hat ein breites Wirkungsspektrum, das grampositive und gramnegative Bakterien und Chlamydien, ebenso Plaque- und Biofilm-bildende Bakterien sowie Mykoplasmen einschließt. In vitro zeigt es inaktivierende Eigenschaften gegen HIV-1 und HSV. Bei einer PHMB-Konzentration von 0,025 % oder in Kombination mit Propamidin und Neomycin ist es wirksam bei der Akanthamöbenkeratitis (Hübner u. Kramer 2010a). Eine gute Verträglichkeit weist PHMB bei der Anwendung auf Haut, Wunden, Auge, Nase und Flimmerepithel auf (Kramer u. Roth 2008c; Dissemond et al. 2011; Kramer et al. 2010a).

Zur Anwendung kommt PHMB in alkoholischen Lösungen zur Hautantiseptik und Händedesinfektion, des Weiteren in nicht alkoholischen Lösungen zur Wund- und Schleimhautantiseptik. Bei chronischen Wunden sowie bei Verbrennungen ist es das Mittel der ersten Wahl (Kramer et al. 2010a, 2013b; Hübner u. Kramer 2010a). Kontraindikationen für PHMB sind bekannte Allergien gegen den Wirkstoff, die Anwendung als Peritonealspüllösung, im ZNS, Mittel- und Innenohr, sowie innerhalb der ersten vier Schwangerschaftsmonate. Für hyalinen Knorpel sind Konzentrationen > 0,005 % unverträglich (Kramer u. Roth 2008c).

1.2.3 Octenidindihydrochlorid (Octenidin/OCT)

OCT ist ein kationaktives Bispyridin. Gelöst ist es geruchlos und farblos. OCT interagiert mit der Zellmembran, was zur Inaktivierung der mikrobiellen Zelle führt. Schon in geringer Konzentration (0,01 %) wirkt es stark mikrobiozid (Verminderung der Erregerzahl > 5 log). OCT kann als alleiniger Wirkstoff oder in Kombination mit 2-Phenoxyethanol verwendet werden. Dieses Antiseptikum besitzt ein breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien, bestimmte Virusspezies wie dem Herpes-simplex-Virus oder dem Hepatitis-B-Virus, sowie gegen Pilze und Protozoen (Kramer et al. 2008b; Hübner et al. 2010c). In Deutschland wurde Octenidin 1990 als Schleimhautantiseptikum zugelassen und dessen Anwendungsbereich 1995 um die Wundbehandlung erweitert (Bültemann et al. 2009). Bislang gibt es keine Anhaltspunkte für Risiken in Bezug auf karzinogene, mutagene, teratogene, embryotoxische und fertilitätsbeeinträchtigende Wirkungen (Kramer 2001). OCT weist eine hohe Eiweißbindung auf, ist haut-, schleimhaut und gewebeverträglich und hat eine remanente, rasch einsetzende antimikrobielle Wirksamkeit. Dermal wird OCT nicht resorbiert. Es ist keine Resistenzentwicklung nachgewiesen. Gleiches gilt für allergische Risiken. Kontraindikationen sind Spülungen in der Bauchhöhle, der

Harnblase sowie wegen der Knorpeltoxizität die Anwendung auf Knorpelgewebe, im Innenohr oder am Trommelfell (Kramer et al. 2004). Des Weiteren darf das Antiseptikum nicht unter Druck ins Gewebe eingebracht oder injiziert werden und ein Abfluss über eine Drainage oder Lasche muss gegeben sein (Hülsemann u. Habenicht 2011).

1.3 Einsatz von physikalischem Plasma in der Medizin

In der modernen Physik wird mit dem Begriff Plasma der sogenannte vierte Aggregatzustand beschrieben. Neben den 3 klassischen Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig ist Plasma ein vollständig oder teilweise ionisiertes Gas. Das Plasma enthält neben neutralen Molekülen und Atomen freie Ladungsträger wie Ionen, freie Elektronen und Radikale (Koban et al. 2011). Die erforderliche Ionisationsenergie kann durch elektromagnetische Strahlung, wie Mikrowellen, UV- oder Gammastrahlen, durch Zuführung kinetischer Energie mittels Erwärmung oder durch elektrische Leistung erreicht werden (von Woedtke et al. 2008). Den Begriff Plasma prägte der US-amerikanische Chemiker und Physiker Irving Langmuir im Jahr 1928, da ihm die Materie, mit der er experimentierte, mit ihren vielfältigen Komponenten an Blutplasma, dem zellfreien aber protein- und elektrolytreichen flüssigen Bestandteil des Blutes erinnerte (Langmuir 1928; Tonks 1967).

Plasma kann verschiedene Charakteristika aufweisen. Je nach Anregungs- und Existenzbedingungen lässt sich Plasma als schwach ionisierend und vollständig ionisierend, thermisch und nicht-thermisch sowie anhand des vorherrschenden Drucks in Hoch-, Normal- und Niederdruckplasma einteilen (von Woedtke et al. 2008).

Bei nichtthermischem Plasma, das mit Hilfe eines elektrischen Feldes erzeugt wird, werden die um den Kern kreisenden Elektronen durch von außen auf sie einwirkende Energie auf mehrere Tausend Grad Celsius erwärmt. Die schwereren Ionen und neutralen Moleküle hingegen nehmen kaum Energie auf und bleiben kühl (Ehlbeck et al. 2011). Für medizinische Anwendungen sind Plasmen im Bereich der Körpertemperatur und bei Normal- bzw. Atmosphärendruck notwendig, um Behandlungen an Patienten zu ermöglichen (Weltmann et al. 2011).

Mögliche Einsatzbereiche von Plasma an Patienten bestehen in der Dermatologie zur Behandlung verschiedener Hautkrankheiten (Daeschlein et al. 2010a, 2010b, 2011; Heinlin et al. 2010) und chronischer Wunden (Kramer et al. 2013b), aber auch zur Behandlung oberflächlicher Tumoren und zur Stillung von Blutungen mittels

Elektrokauterisation (Fridman et al. 2008; Partecke et al. 2012). Zusätzlich wird Plasma auch in der Zahnheilkunde erprobt (Sladek et al. 2007; Koban et al. 2009; Rupf et al. 2009, 2010, 2011). Die biologischen Wirkungen des Plasmas werden vor allem durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, wie das Hydroxyl-Radikal, Singulett-Sauerstoff, Ozon oder Stickoxide und ihre Sekundärprodukte im Medium oder an der Zellmembran hervorgerufen (Reuter et al. 2009, 2012; Wende et al. 2013) ebenso sind quellenabhängig UV-Strahlen, das elektromagnetische Feld und die Entwicklung von Wärme an der Wirkung beteiligt (Lee et al. 2011). Für die antimikrobielle Wirkung sind besonders reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen sowie UV-Strahlung verantwortlich (Matthes et al. 2013a).

Zur Generierung von Atmosphärendruckplasmen sind Edelgase wie Helium oder Argon geeignet. Zum einen ist die Plasmachemie bei Verwendung von Edelgasen einfacher als z. B. die Erzeugung von Luftplasma, und somit besser regulierbar; zum anderen können niedrigere Temperaturen erreicht werden (Iza et al. 2008). Zur Generierung von Niedertemperaturplasmen bei Atmosphärendruck werden differente Methoden verwendet, um direktes Plasma, indirektes Plasma oder so genanntes Hybridplasma zu erzeugen.

Direktes Plasma entsteht, wenn die zu behandelnde Oberfläche die Gegenelektrode zur dielektrisch behinderten Elektrode ist. Dabei erfolgt die Gasentladung direkt auf die zu behandelnde Oberfläche, z. B. die Wunde (Kong et al. 2009).

Bei indirektem Plasma wird das Trägergas zwischen zwei gegenüberliegenden Elektroden in den Plasmazustand versetzt und auf die zu behandelnde Oberfläche geleitet (Kong et al. 2009). Diese Methode wird vor allem bei Jet-Plasmen, z. B. dem kINPen09[®] und dem KinpenMed, verwendet (Weltmann et al. 2009). Es gibt auch die Möglichkeit, beide Verfahren zu kombinieren, diese werden als Hybridplasma bezeichnet. Dabei wird der elektrische Strom des direkten Plasmas über ein leitendes Netz mit einem geringeren elektrischen Widerstand als das zu behandelnde Substrat wie z. B. die Wunde abgeleitet (Kong et al. 2009; Morfill et al. 2009).

1.3.1 Anwendung von Plasma zur Wundbehandlung

Die Plasmaanwendung an Haut und Wunden setzt voraus, dass es sich um gewebeverträgliches Plasma (TTP) handelt, d. h., dass die Temperatur des Plasmas im physiologischen Bereich liegt und 41 °C nicht überschreiten sollte. Darüber hinaus

sollte die UV-Exposition vernachlässigbar gering sein, und es darf nur moderate akute und keine chronischen Entzündungen hervorrufen. Eine erste Plasmaquelle, die wichtige Charakteristika eines TTP aufweist, ist der Plasmajet kINPen09[®]. Seine Gewebeverträglichkeit für Argonplasma konnte in Bezug auf thermische- und UV-Belastung nachgewiesen werden (Lademann et al. 2009, 2010). Ebenso erfolgten Untersuchungen zum Einfluss auf das antioxidative Potential der Haut und weitere physiologische Parameter, wobei die Gewebeverträglichkeit des kINPen09[®] gesichert werden konnte (Fluhr et al. 2011). Sofern auch Langzeitrisiken wie Mutagenität und Karzinogenität ausgeschlossen werden, könnte Plasma zur Förderung des Wundheilungsprozesses eingesetzt werden.

Ein vielversprechendes Anwendungsgebiet für TTP ist die Eliminierung bzw. Hemmung von Biofilmen. Die antiseptische Wirkung von TTP wurde experimentell *in vitro* (Kramer et al. 2010b; Koban et al. 2011, 2012; Fricke et al. 2012; Gorynia et al. 2013; Matthes et al. 2013a, b) sowie mittels Behandlung kontaminierter Augen vom Schlachtschwein nachgewiesen (Hamann et al. 2010). Die physikalische Antiseptik mittels TTP stellte sich dabei der chemischen Antiseptik in Wirksamkeit und Gewebeverträglichkeit ebenbürtig dar (Kramer et al. 2010b). Der entscheidende Vorteil im Vergleich zu Antiseptika ist jedoch die Möglichkeit, den Heilungsprozess der chronischen Wunde anzuregen (Bender et al. 2012). Wesentlich sind dabei neben der antimikrobiellen Wirkung, die Gewebeerwärmung sowie die Förderung der Angiogenese und der Zellproliferation (Kramer et al. 2010b; Bender et al. 2011; Lademann et al. 2011).

1.3.2 Eigenschaften der verwendeten Erreger

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Mikroorganismen, die Biofilmbildner und häufige Erreger nosokomialer Infektionen oder Infektionen immungeschwächter Patienten sind, verwendet: *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. mutans* und *S. sanguinis*.

***C. albicans*:** Die einzelligen Hefen besiedeln aquatische oder feuchte Standorte. Die Vermehrung findet durch Sprossung statt. Zu den Deuteromyceten gehören Hefen mit vegetativer Fortpflanzungsform. Als Askomyzeten oder Basidiomyzeten bezeichnet werden die Pilze, die sich sexuell vermehren und Sporen bilden. Es leben ca. 200 verschiedene *Candida*-Arten in der Umwelt, wobei der wichtigste Vertreter opportunistischer Pilzinfektionen, der beim Menschen vorkommt, *C. albicans* ist. Unterscheiden lässt sich *C. albicans* von anderen Hefen durch die Bildung von

Chlamydosporen (Dauersporen) (Blaschke-Hellmessen u. Schönian 2001; Schütt-Gerowitt u. Rüchel 2001). Häufig imponieren die Kolonien als runde, ovale oder länglichen Zellen, die abhängig von der Art und den Vermehrungsbedingungen ein Pseudomycel (Zellketten) oder ein echtes Mycel ausbilden können. Dessen Durchmesser beträgt ca. 4 µm und ihre Kolonien besitzen einen hefeartigen Geruch. Die Hefe findet sich bevorzugt als harmloser Kommensale beim gesunden Menschen auf der Haut, in der Mundhöhle, im Gastrointestinaltrakt, in der Vagina, aber auch im vaskulären System (Calderone u. Fonzi 2001). Im Allgemeinen kommt es zu Infektionen bei zellulärer Abwehrbeeinträchtigung oder bei im Rahmen von anderen Grunderkrankungen auftretenden Stoffwechsellentgleisungen wie Diabetes mellitus, bei immunsuppressiver Therapie, nach Operationen oder bei Tumorerkrankungen.

C. albicans ist als opportunistischer Krankheitserreger verantwortlich für ein breites Spektrum von lokalen und systemischen Mykosen, die sich klinisch als kutane, subkutane und Organmanifestationen äußern können (Garber 2001). Es können oberflächliche oder tiefe Candidosen auftreten. Soor, Onychomykose, intertriginöse Candidose, Balanitis, Vulvovaginitis sowie Windeldermatitis bei Säuglingen zählen zu den oberflächlichen Haut- und Schleimhautcandidosen. Zu den typischen Krankheitsbildern der tieferen Gewebeschichten zählen Sepsis, Pneumonien, Darminfektionen und Peritonitiden (Holtmann u. Bobkowski 2008). *C. albicans* ist zudem ein Biofilmbildner (Ribeiro de Freitas et al. 2013). Bei der Biofilmbildung von *C. albicans* auf Implantaten sind hauptsächlich das Zusammenspiel der Zellwandadhäsine und die Struktur des Implantats für die Haftung von Candida an der Implantatmembran verantwortlich. Die Zellwandadhäsine bewirken zudem die Adhärenz an die menschlichen Wirtszellen und der Sprossspitze untereinander (Cuéllar-Cruz et al. 2012). Die Sprossspitzelle bietet bei der Therapie der Mykosen nur eine eingeschränkte Auswahl von Angriffspunkten an. Deshalb sollte die antimykotische Medikation möglichst früh und in ausreichender Dosierung nach den gebräuchlichen Standards eingesetzt werden (Büchner et al. 2002).

P. aeruginosa: *P. aeruginosa* ist ein gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium mit einer Größe von 1,5 - 5,0 µm der Gattung Pseudomonas. Es besitzt bescheidene Nähransprüche und ist unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen lebensfähig (Madigan u. Martinko 2006). Es wird zu den Nonfermentern gezählt, da es Glucose nur oxidativ und nicht fermentativ abbauen kann. *P. aeruginosa* ist ein ubiquitär in der Umwelt vorkommender Erreger, der auf Tieren, Pflanzen, Boden und in Gewässern vorkommt. Aufgrund der hohen Resistenz sind diese Erreger typisch für Hospitalinfektionen. Da es ein Bewohner feuchter Habitate ist, kommt er dort vor

allem in Duschen, Waschbecken, Toiletten aber auch auf Instrumenten vor (Steinmetz 2009). Seinen Namen „*aeruginosa*“ (aeruginosus = grünspanartig) erhielt das Bakterium durch die grüne Verfärbung der Wundverbände (Hof u. Dörries 2005). Von Bedeutung für die Motilität, Biofilmbildung und Adhärenz an Wirtszellen sind die an seiner Oberfläche haftenden Pilli und Flagellen (Steinmetz 2009). Biofilmbildende Stämme bilden Alginate, das das Haupt-Polysaccharid der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) ist (Grobe et al. 1995). Bei Patienten mit cystischer Fibrose und einer Infektion mit *P. aeruginosa* bildet der Erreger einen Biofilm in den Atemwegen und kann aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit und des Schutzes des Biofilms dort persistieren (Donaldson u. Boucher 2003). *P. aeruginosa* kann verschiedene Pigmente bilden, zu denen Pyoverdin, Pyocyanin und Pyorubin gehören und die ihm seine typische Färbung verleihen. Exotoxine, Proteasen und Rhamnolipide sind zusätzliche Pathogenitätsfaktoren (Döring 1987). *P. aeruginosa* führt bei gesunden Personen normalerweise zu keinen Komplikationen; er kann jedoch bei immungeschwächten Menschen, postoperativ und bei Devices schwerwiegende Infektionen hervorrufen. Er kann Keratitis, Otitis externa maligna, Pneumonien, Wundinfektionen, Endokarditis, Sepsis und Harnwegsinfektionen verursachen (Hof u. Dörries 2005). Eine Diffusionsbarriere für Antibiotika stellt die äußere Alginatekapsel bzw. Biofilmhülle des Bakteriums dar. Sie ist eine Ursache der geringen Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika (Hodges et al. 1991; Stewart et al. 1996).

***S. epidermidis*:** Bei diesen Staphylokokken handelt es sich um grampositive, fakultativ anaerobe nicht sporenbildende Kugelbakterien, die sich traubenförmig in Haufen anordnen und einen Durchmesser von ca. 1 µm aufweisen. Klinisch werden sie unterschieden in koagulasepositive und koagulasenegative Spezies, wobei die Farbe ihrer Kolonien weiß bis leicht elfenbeinfarbig erscheint. Vorzufinden sind koagulasenegative Staphylokokken vor allem als normale Bewohner auf der Haut und Schleimhaut des Menschen, wo sie bei Gesunden nur selten Infektionen auslösen. Zu den wichtigsten Vertretern gehört *S. epidermidis*, der häufig Ursache nosokomialer kunststoffassoziiertes Infektionen ist. Ein erhöhtes Risiko besteht insbesondere bei immungeschwächten Patienten, bei Patienten mit Dauerkatheter und bei Neugeborenen (Lütticken u. Kaufhold 1994). Er führt bei 10 - 30 % der Katheteranlagen, wie Venenkatheter oder Ernährungssonden, zu Infektionen und ist häufig der Grund für die Entstehung der Endokarditis bei Patienten mit künstlichen Herzklappen (Steinmetz 2009). Durch Oberflächenmoleküle, wie einem polysaccharidhaltigen Schleim, der auch als Kolonisations- oder kritischer Faktor bezeichnet wird (Christensen et al. 1982), haftet sich der Erreger an die

Katheteroberfläche und führt zugleich zur Vernetzung der Bakterien untereinander. Die Biofilmmatrix schützt den Erreger vor Abwehr und Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie vor dem Eindringen von Antibiotika. Therapeutisch begegnet man dem Bakterium mit Glykopeptiden (Vancomycin, Teicoplanin) oder Oxazolidinonen (Linezolid), da ca. 80 % der Stämme in den Kliniken Resistenzen gegen Penicillin und Oxacillin aufweisen (Steinmetz 2009).

Der in der Arbeit verwendete schleim- und biofilmbildende Stamm *S. epidermidis* RP 62A wurde zwischen 1979 und 1980 in Memphis, Tennessee, bei einem Ausbruch von intravaskulären Katheter-assoziierten Sepsen isoliert (Gill et al. 2005) und wird aufgrund langjähriger Untersuchungen von vielen Forschungsgruppen als Biofilmbildner genutzt (König et al. 2001; Sadovskaya et al. 2005). Der schlecht (Okajima et al. 2006) bzw. nicht-biofilmbildende ambulante MRSA-Stamm ATCC 12228 wurde 1998 von einem 16 Monate alten Mädchen isoliert (Gill et al. 2005).

***S. mutans* und *S. sanguinis*:** Streptokokken sind grampositive, unbewegliche nicht sporenbildende Bakterien, die sich in Ketten oder Paaren anordnen. Sie besitzen die Fähigkeit, sich sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen zu vermehren. Es gibt viele Arten der Gattung Streptococcus, die oft der Normalflora der menschlichen Haut und Schleimhaut angehören. Abhängig von den Kulturbedingungen und der Nährbodenzusammensetzung werden die Streptokokken nach ihrem Hämolysevermögen auf Blutagar in drei Gruppen eingeteilt (Seeliger 1978; Hof u. Dörries 2005):

1. β -Hämolyse:

- vollständige Hämolyse (keine intakten Erythrozyten)
- Kolonien umgeben von einem farblosen Hof
- Wirkung beruht auf der Bildung verschiedener Hämolsine
- typischer Vertreter ist *Streptococcus pyogenes*

2. α -Hämolyse:

- nicht vollständige Hämolyse (noch intakte Erythrozyten)
- Kolonien umgeben von einem grünen Hof
- Vergrünung beruht auf Freisetzung von H_2O_2
- typische Vertreter sind *Streptococcus salivarius* und *S. pneumoniae*

3. γ -Hämolyse:

- fehlende Hämolyse (keine Erythrozytenveränderung).

Die Einteilung der β -hämolisierenden Streptokokken beruht auf typenspezifischen Zellwand- bzw. Zelloberflächenantigenen und erfolgt nach der Lancefield-Klassifikation

(Lütticken u. Kaufhold 1994). Nach dieser Gruppierung lassen sich diese Erreger in die verschiedenen Serogruppen einteilen. *Streptococcus agalactiae* (B-Streptokokken) und *Pneumokokken* rufen Infektionen wie oberflächliche oder tiefe Eiterungen, Sepsis, Scharlach und Meningitis hervor. Die vergrünenden Streptokokken besitzen keine Lancefield-Gruppenantigene. Die Antigenstruktur der Polysaccharidkapsel lässt dennoch eine Unterteilung in unterschiedliche Serovare zu (Hof u. Dörries 2005).

Zu den Viridans- und nicht hämolytischen Streptokokken gehören vor allem die oralen Streptokokken, zu denen *S. mutans* und *S. sanguinis* gezählt werden, die Bestandteil der physiologischen Bakterienflora der Haut und Schleimhäute sind. Sie können sich anaerob vermehren und befinden sich beim Menschen auf der Zahnoberfläche und auf der Rachenschleimhaut. Die Übertragung der Erreger erfolgt bereits im 1. Lebensjahr von der Mutter auf das Kind. Bei der Kariogenese hat das Dextran, welches von *S. mutans* gebildet wird, eine tragende Bedeutung, weil es als Matrix der Plaquebildung dient. *S. mutans* ist weltweit die Hauptursache von Karies und wird als der am meisten kariogene Vertreter der oralen Streptokokken betrachtet (Ajdić et al. 2002). *S. sanguinis* besitzt eine bemerkenswerte Fülle von Oberflächenproteinen, die es ihm ermöglichen, ein primärer Kolonisator der Mundhöhle zu sein sowie Infektionen bei neutropenischen Patienten auszulösen. Wenn die Erreger über die Blutbahn zum Herzen gelangen und sich dort beispielsweise an den rheumatisch vorgeschädigten Herzklappen ansiedeln, kann das zur Streptokokken-Endokarditis führen (Ping et al. 2007; Sladek et al. 2007; Kajfasz et al. 2009).

1.3.3 Nosokomiale Bedeutung der Biofilmbildung

Eine der ältesten Formen des Lebens stellen Biofilme dar. Sie sind beinahe ubiquitär vorhanden und können von zahlreichen Mikroorganismen produziert werden. Es wird vermutet, dass 99 % aller Erreger in einer solchen schleimartigen Schicht vorkommen (Costerton et al. 1987). Insbesondere dort, wo Wasser und Nährstoffe vorhanden sind, findet man Biofilme. An Grenzflächen wie z.B. Gas- und Flüssigphasen (Wasserdampf in der Luft), Flüssig- und Festphasen (Minerale in Gewässern, Rohrwandungen) oder auch Flüssig- und Flüssigphasen (Öltropfen in Wasser) können sich die Mikroorganismen ansiedeln.

Biofilme bestehen aus einer Ansammlung von Bakterien, die die Eigenschaft besitzen, Polysaccharide abzusondern (Madigan u. Martinko 2006). Daraus entsteht eine Matrix aus Wasser und extrazellulären polymeren Substanzen, die die Mikroorganismen

umgibt. Diese EPS bestehen hauptsächlich aus Proteinen, Lipiden, Nucleinsäuren und Huminstoffen und stabilisieren den Biofilm in seiner Form.

Die zahlreichen Lebensformen innerhalb des Biofilms leben symbiotisch zusammen. Er schützt die Mikroorganismen vor externen schädigenden Faktoren, wie Angriffe durch das Immunsystem des Wirts, und führt zu erhöhten Resistenzen gegen Noxen und Medikamente wie z. B. Antibiotika (Gilbert 1995; Reid 1999). Gleichzeitig ermöglicht der Biofilm dem Erreger, für längere Zeit ohne Zufuhr von Nährstoffen auszukommen (Davies et al. 1998; Strathmann 2003).

Biofilme spielen in der medizinischen Praxis eine große Rolle. Der bedeutendste Übertragungsweg nosokomialer Erreger sind die Hände von Krankenhauspersonal und Patienten sowie der Kontakt von Medizinprodukten mit kontaminiertem Leitungswasser (Donlan 2001). Dadurch können die biofilmbildenden Erreger auf Kunststoffe von Implantaten, Kathetern und medizinischen Instrumenten übertragen werden und einen Biofilm bilden. Einige Mikroorganismen, wie Staphylokokken, besitzen zudem eine besondere Affinität zu Oberflächenstrukturen biologischer Materialien (Patti 2005).

Die Gefahr, die für den Patienten von den Biofilmen ausgeht, ist die schwere therapeutische Erreichbarkeit und die Ablösung der Bakterienmassen aus dem Biofilm und Aufnahme in den Körper, was zu chronischen oder rezidivierenden Infektionen bis hin zur fulminanten Sepsis führen kann, was insbesondere immunsupprimierte Patienten betrifft. Biofilme können unter anderem zu Wundinfektionen, bakterieller Endokarditis oder Zahnkaries führen (Costerton et al. 1999; Drenkard u. Ausubel 2002; Hall-Stoodley et al. 2004).

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Methoden

2.1.1 Materialien

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Materialien verwendet und die in Tabelle 2 angegebenen Erreger und Nährmedien eingesetzt.

Tab. 1: Verwendete Materialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller (REF)
Impfösen	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, D
Probenröhrchen 12 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, D
Probenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, D
Mikrotiterplatten, 96 Well	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Pipettenspitzen, ep T.I.P.S. S Standard 50-1000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Polystyrol-Küvetten (Plastibrand®)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, D
Medien	
Sabouraud-4 %-Glucose- Agar	Carl Roth, Karlsruhe (x932.1), D
CSA	Carl Roth, Karlsruhe (x937.2), D
Hirn-Herz-Bouillon und Agar	BBL, Becton Dickinson France, Le Pont De Claix, F
YPD	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Antiseptika	
Chlorhexidindigluconat	Fagron GmbH & Co KG, Barsbüttel, D
Octenidin	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
Polihexanid	Fagron GmbH & Co KG, Barsbüttel, D
Geräte	
Thermo Scientific Evolution 600 Spectrophotometer	Thermo Scientific Heraeus, Hanau, D

Fortsetzung Tab. 1: Verwendete Materialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller (REF)
Anthos Microplate ELISA-Reader 2020	anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, D
Wärmeschrank Heraeus BR 6000	Thermo Scientific Heraeus, Hanau, D
Plasmaquelle: KINPen09 [®]	neoplas tools, Greifswald, D
Plasmaquelle: Hohlelektroden-DBD	Leibniz-Institut, Greifswald, D
xyz-Tisch: EDX-20 (modifiziert)	Roland DG, Oevel (Westerloh), B
Vortexer	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Dampftopf DFEH Varioklav	H+P Labortechnik GmbH, Hackermos, D
Autoklav: Typ Vakulab HP 669-2HR	Münchener Medizin Mechanik, Planegg / München, D
Pipetten Research (100-1000 µl, 200 µl, 5000 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D

Die verwendeten Prüforganismen sind Bestand der Stammbank des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald. *C. albicans* SC 5314 wurde von Frau Prof. Bernhardt, Klinik für Innere Medizin A der Universitätsmedizin Greifswald, und *P. aeruginosa* SG 81 von der AG Flemming der Universität Duisburg bezogen (Tab. 2).

Tab. 2: Prüfmikroorganismen und deren Nährmedien

Prüforganismen	Medium-Bouillon	Medium-Agar
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	YPD	SG-A
<i>C. albicans</i> SC 5314	YPD	SG-A
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	CSL	CSA
<i>P. aeruginosa</i> SG 81	CSL	CSA
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	CSL	CSA
<i>S. epidermidis</i> RP 62A	CSL	CSA
<i>S. mutans</i> DSM 20523	HH	HH-A
<i>S. sanguinis</i> DSM 20068	HH	HH-A

Gemäß den Herstellerangaben wurden die pulverartigen Fertigmedien (YPD, CSL, HH und SG-A, CSA, HH-A) mit Aqua demin. versetzt und unter Rühren gelöst. Anschließend wurde das Gemisch 15 min bei 121 °C im Autoklaven (Vakulab HP 669-2HR, Münchener Medizinmechanik) sterilisiert. Die Medien für den Agar wurden anschließend im Wasserbad auf 55 °C abgekühlt und in sterile Petrischalen gegossen. Die so hergestellten Agarplatten und Flüssigmedien wurden nach Abkühlen auf Zimmertemperatur zur Kultivierung der Mikroorganismen verwendet. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4 - 8 °C für maximal 4 Wochen.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) Nährmedium ist für die Kultivierung von Hefekulturen geeignet (Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition, www.bd.com). Die Medien CSL oder CSA (Casein-Soja-Pepton-Lösung oder -Agar) bestehen im Wesentlichen aus Casein-Pepton und Sojamehlpepton und sind ein Standardnährmedium für eine Vielzahl verschiedener anspruchsvoller Bakterien- und z. T. auch Pilzstämmen (diagnostika). Der Hirn-Herz-Glucose(HH)-Agar oder die Bouillon werden zur Kultivierung vieler Mikroorganismen, u. a. *Streptococcus* und *Pneumococcus spp.* eingesetzt (Produkt-Datenblatt, Hirn-Herz-Glucose Bouillon, www.carlroth.de). Der Sabouraud-Dextrose-Agar (SG-A) wird zur Anzucht verschiedener Pilze, wie z. B. *Candida spp.*, verwendet (Sabouraud Dextrose Agar, www.neogen.com).

2.1.2 Herstellung der Subkulturen und Erregersuspensionen

Erste Subkultur: Die Bakterienstämmen und *Candida spp.* wurden bei -70 °C in Kryo-Röhrchen im Tiefgefrierschrank gelagert. Aus jeweils einem der Kryo-Röhrchen wurde mittels eines sterilen Glasspatels unter aseptischen Bedingungen eine mit dem gewünschten Erreger beladene Glasperle entnommen und auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Nährmedium (Tab. 2) ausgerollt. Anschließend wurde die Platte 24 h bei 37 °C bebrütet. Die so entstehende erste Subkultur ist im Kühlschrank bei 4 °C gelagert vier Wochen verwendbar.

Zweite Subkultur: Jeweils 1 d (bei *S. mutans* und *sanguinis* 2 d) vor Versuchsbeginn wurden die Mikroorganismen der ersten Subkultur mit einer Impföse erneut auf Agar mit den entsprechenden Kulturmedien ausgestrichen. Im Anschluss daran erfolgte die Bebrütung der 2. Subkultur bei 37 °C für 24 h (bei *S. mutans* und *S. sanguinis* 48 h). Die zweite Subkultur wurde für die Erstellung des Inokulums verwendet.

Inokulum: Mittels einer Impföse wurden die Mikroorganismen der zweiten Subkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 30 ml der entsprechenden Bouillonlösung (Tab. 2) überführt, durch Schütteln resuspendiert und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation enthielten die Erregersuspensionen 10^8 - 10^9 KbE/ml (bei *C. albicans* 10^7 - 10^8 KbE/ml), wovon das Inokulum für den Versuchsansatz in den entsprechenden Konzentrationen durch dekadische Verdünnung (1 ml in 9 ml) in den entsprechenden Medien erstellt wurde.

Zur Erstellung der Vermehrungskurven in den Vorversuchen wurden Erregersuspensionen mit den Startkonzentrationen 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 KbE/ml eingesetzt.

2.1.3 Analyseverfahren

Ermittlung der KbE: Hierzu wurden alle Verdünnungen im Verhältnis 1:10 angelegt, indem jeweils 100 µl von der Testsuspension entnommen, in eine Küvette gegeben und 900 µl Medium hinzugegeben wurden. Die erste 1:10 Verdünnung wurde als 10^{-1} gekennzeichnet. Von dieser Verdünnung ausgehend wurden nach Durchmischung jeweils 100 µl in eine neue Küvette mit 900 µl Medium gegeben, bis die Verdünnungsstufe 10^{-8} erreicht wurde. Aus den verschiedenen Verdünnungsstufen wurden jeweils 100 µl auf jeweils zwei Agarplatten (Doppelbestimmung) gegeben und die Flüssigkeit mit einem sterilen Drigalski-Spatel über die gesamte Agarfläche verteilt. Die Platten inkubierten anschließend mit dem Boden nach oben für 24 h bei 37 °C im Brutschrank. Die KbE wurde mittels Zählgerät ermittelt. Für die weitere Auswertung wurden nur die Verdünnungsstufen verwendet, bei denen zwischen 15 und 300 KbE pro Petrischale gezählt wurden. Von jeweils zwei Platten wurde das arithmetische Mittel der einen Verdünnungsstufe berechnet. Davon wurden die Ausgangs-Erregerzahl bestimmt und der dekadische Logarithmus gebildet. Die damit gewonnenen Werte wurden im Rahmen der Vorversuche mit denen der OD verglichen und gegenübergestellt.

Ermittlung der optischen Dichte (OD) mittels Photospektrometer: Das Verfahren basiert auf der Detektion eines durch Streuung, Beugung, Reflexion oder Absorption nach Durchtritt durch ein Probenmedium geschwächten Lichtstrahls. Die Schwächung des detektierten Lichts ist proportional zur Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in der Probe, was im Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben wird. Dieses fasst die Abschwächung (Extinktion) einer bestimmten Strahlenintensität beim Durchscheinen eines Mediums mit einer absorbierenden Substanz in Abhängigkeit von

der Konzentration und der Schichtdicke dieser Substanz mathematisch zusammen (Pschyrembel 2002; Trautwein et al. 2004a, b; Skrabal 2009):

$$E = \lg(I_0/I_1) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

- E: Extinktion der Substanz
- I_0 : Intensität des einfallenden Lichtstrahls ($W \cdot m^{-2}$)
- I_1 : Intensität des transmittierten Lichts ($W \cdot m^{-2}$)
- $E\lambda$: spezifischer Extinktionskoeffizient
- c: Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz ($mol \cdot l^{-1}$)
- d: Schichtdicke der durchstrahlten Substanz (m).

Das von einer Lichtquelle ausgesandte polychromatische Licht wird durch einen Monochromator auf die Wellenlänge 600 nm selektiert und durch die zu untersuchende Probe geschickt. Die in durchsichtigen Küvetten befindlichen Suspensionen aus wässrigen Bakterien- und Pilzproben schwächen das durchtretende monochromatische Licht im Wesentlichen durch Streuung und Absorption. Diese Schwächung wird als OD detektiert und anschließend auf einem Bildschirm als Zahlenwert wiedergegeben (Thermo Fisher Scientific Inc. 2007; Skrabal 2009).

2.1.4 Durchführung der Versuche

Voruntersuchung mit dem Thermo Scientific Evolution 600 Spectrophotometer:

In den Voruntersuchungen wurden erregerspezifische Vermehrungskurven anhand der KbE/ml- und der OD- Ermittlung im Thermo Scientific Evolution 600 Spectrophotometer (Abb. 2) erstellt. Hierfür wurden 1000 μ l des Inokulums mit den Erregern *C. albicans* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. mutans* DSM 20523 und *S. sanguinis* DSM 20068 in Küvetten mit den Startkonzentrationen 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 KbE/ml eingesetzt und die Vermehrungsraten halbstündlich bei 540 nm, 600 nm und 660 nm bis 24 h bestimmt. Zwischen den Messungen inkubierte die Suspension im Erlenmeyerkolben bei 37 °C im Brutschrank.

Somit konnte die Korrelation der optischen Dichte zu der Zahl der KbE/ml erstellt werden.



Abb. 2: Thermo Scientific Evolution 600 Spectrophotometer
(aus: <http://www.directindustry.de>)

Hauptuntersuchungen mit dem Biochrom Anthos 2020 Microplate Reader: Für die Hauptuntersuchung der Vermehrungskinetik verschiedener Mikroorganismen nach antiseptischer Behandlung wurde der Biochrom Anthos 2020 Microplate Reader (Abb. 3) verwendet, der nach einer vergleichbaren Funktionsweise wie das Evolution 600 arbeitet. In ihm können in der 96 Well-MTP die OD-Werte bei kürzeren Untersuchungszeiten in bis zu 96 Einzelproben nahezu zeitgleich gemessen werden. Mit dieser Methode wurden die Prüfstämme nach Behandlung mit CHX, PHMB, OCT und Plasma mit dem kINPen09[®] bzw. mit der Hohlelektrode mittels Argonplasma bzw. Argongas allein bzw. mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff analysiert.

Für die antiseptische Exposition wurden je 100 µl Inokulums mit je 10⁵ KbE/ml in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden je 100 µl der entsprechend vorbereiteten Konzentration der Antiseptika zugegeben bzw. 100 µl Medium bei der unbehandelten Kontrolle.

Für die Behandlung mit Plasma wurde das Medium zuvor abgenommen, das Plasma in die Wells appliziert und anschließend erneut auf 200 µl mit sterilem Medium aufgefüllt. Für die Bestimmung des Leerwerts wurden 200 µl Medium gemessen. Bei den Hauptversuchen erfolgte die Messung der OD bei 620 nm jede halbe Stunde für die Vermehrungskurven ohne Erregerbehandlung und jede Stunde nach Exposition der Erreger mittels Microplate-Reader (Abb. 3). In den Wells befanden sich stets 200 µl der Erregersuspension. Zwischen den Messungen inkubierten die Mikrotiterplatten mit den Testorganismen bei 37 °C im Brutschrank. Die Messungen erfolgten bis 32 h stündlich. Die Testabläufe wurden jeweils acht Mal parallel durchgeführt. Aus den Einzelproben je Behandlung wurde der Mittelwert gebildet. Diese Mittelwerte wurden in Abhängigkeit

von der Untersuchungszeit in Diagrammen dargestellt. Durch die Interpolation fehlender Werte konnte für jede Behandlung eine Vermehrungskurve erstellt werden.

Die Fläche unter dieser Kurve (AUC) wurde nach der Trapezregel ermittelt und diente für die statistische Auswertung, d. h. dem Vergleich der Vermehrungskurven der Prüforganismen bei den verschiedenen Behandlungen. Je kleiner die AUC ist, umso besser wirkte die antiseptische Behandlung der Bakterienvermehrung entgegen. Jeder Erreger wurde mit jeder Behandlung verglichen und ebenfalls alle Behandlungen untereinander. Zur Auswertung wurden die Vergleiche mit der Kontrolle herangezogen.

Die Berechnungen einschließlich AUC und Standardabweichungen wurden mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Ehningen, Deutschland) durch Prof. Dr. Thomas Kohlmann, Leiter der Abt. Methoden der Community Medicine des Instituts für Community Medicine der Universitätsmedizin Greifswald, durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ gewählt. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden der Mann-Whitney Test angewendet und die asymptotischen Signifikanzwerte (p) in die Tabellen des Ergebnisteils eingetragen. Die Vermehrungskurven wurden mit Microsoft Excel 2010 erstellt.



Abb. 3: Biochrom Anthos 2020 Microplate Reader (aus: <http://www.biochrom.co.uk>)

2.1.4.1 Exposition mit Antiseptika bzw. mit Plasma

Antiseptika: Folgende Antiseptikakonzentrationen wurden eingesetzt: PHMB 0,0002 % und 0,00005 %, CHX 0,0002 % und 0,0000125 %, OCT 0,0004 % und 0,0001 %.

- Zur Herstellung von PHMB 0,0002 % wurden 200 μ l der 0,02 %igen Ausgangslösung in ein Becherglas mit 19,8 ml Wasser gegeben und durch Schwenken vermischt.

- Zur Herstellung von PHMB 0,00005 % wurden 500 µl von der zuvor hergestellten 0,0002 %igen Verdünnung in ein Becherglas mit 1,5 ml Wasser gegeben und durch Schwenken vermischt.
- Zur Herstellung von CHX 0,0002 % wurden 200 µl der 0,1 %igen Ausgangslösung in ein Becherglas mit 99,8 ml Wasser gegeben und durch Schwenken vermischt.
- Zur Herstellung von CHX 0,0000125 % wurden 1,25 ml der zuvor hergestellten 0,0002 %igen Verdünnung in ein Becherglas mit 18,75 ml Wasser gegeben und durch Schwenken vermischt.
- Zur Herstellung von OCT 0,0004 % wurden 2 mg Octenidinhydrochloridpulver in einem Becherglas in 10 ml Wasser gelöst. 400 µl der entstandenen 0,02 %igen Ausgangslösung wurden in ein Becherglas mit 19,6 ml Wasser gegeben und durch Schwenken vermischt.
- Zur Herstellung von OCT 0,0001 % wurden von der zuvor hergestellten 0,02 %igen Ausgangslösung 100 µl in ein Becherglas mit 19,9 ml Wasser gegeben und durch Schwenken vermischt.

Je 100 µl dieser Lösungen wurden 100 µl Erregersuspension hinzugefügt, wodurch bei PHMB als Prüfkonzentration 0,0001 % und 0,000025 %, bei CHX 0,0001 % und 0,00000625 % und bei OCT 0,0002 % und 0,00005 % erzielt wurde. Die Antiseptika verblieben während der Testphase in den Wells.

Die optische Dichte wurde nach Entnahme der Mikrotiterplatte aus dem Brutschrank und anschließendem manuellen Schwenken stündlich bis 32 h für die jeweiligen Antiseptika gemessen. Für die Bestimmung der KbE/ml in den Vorversuchen wurden pro Antiseptikum je 5 Wells bereitgehalten. Im Abstand von 5 h wurden je 100 µl aus einer dieser Wells entnommen und mittels Glasspatel auf Petrischalen mit dem für die Erreger entsprechendem Agar ausgestrichen. Nach 24 h Inkubation wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt.

Die Plasmabehandlung erfolgte mit der Plasmaquelle kINPen09[®] und mit direkter Plasmagenerierung mittels Hohlelektroden-DBD für 60 s. Die Test-Mikroorganismen inkubierten hierfür 2 h bei 37 °C, bevor die Suspension abgenommen und die Plasmabehandlung durchgeführt wurde. Nach der Behandlung wurden die Wells mit 200 µl sterilem Medium aufgefüllt.

Plasma: Der kINPen09[®] (Abb. 4) ist ein Atmosphärendruck-Hochfrequenz-Plasmajet, der aus einer Steuereinheit (8 W bei 230 V, 50 Hz) und einem Handstück (Länge 170 mm, Durchmesser 20 mm, Gewicht 170 g) besteht, durch das das Trägergas geleitet wird (Abb. 5). An dessen Kopfteil wird das Plasma generiert. Im Zentrum einer quarzummantelten Kapillare mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm befindet sich eine nadelförmige Elektrode mit einem Durchmesser von 1 mm. An dieser Elektrode wird während des Betriebs des Gerätes bei einer Eingangsleistung von 3 W und einer Hochfrequenzspannung von 2-6 kV unter einer Frequenz von 1,1 MHz das um die Elektrode mit 5 slm (Standardliter/min) strömende Argongas ionisiert und tritt als ca. 12 mm langer Plasmastrom aus der Öffnung aus. An der Spitze des sichtbaren Plasmastroms wird eine Temperatur von 42 °C (kalorimetrische Messung, Leibniz-Institut Greifswald) mit einer mittleren Wärmeleistung von etwa 150 mW auf der Oberfläche erreicht (Koban et al. 2009; Weltmann et al. 2009). Das Gerät ist CE-zertifiziert und entspricht somit den EU Richtlinien im Bereich Benutzersicherheit und Umweltverträglichkeit.



Abb. 4: Steuergerät und Handstück des kINPen09[®] (aus: <http://www.plastep.eu>)

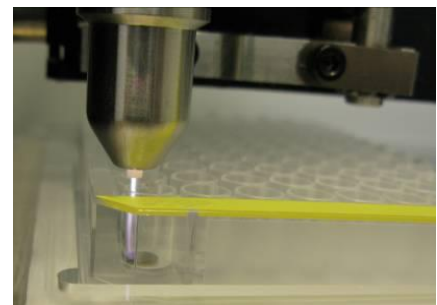


Abb. 5: kINPen09[®] während der Behandlung der Erregersuspension oder von Biofilmen in einer 96-Well-MTP (aus: Koban et al. 2010a)

Das Handstück des kINPen09[®] wurde über einer 96 Well Mikrotiterplatte in einen Computer gesteuerten xyz-Tisch eingespannt (Abb. 5). Die Plasmabehandlung erfolgte je Well mit einem Abstand von 11 mm zwischen der Austrittsöffnung des Plasmas und dem biofilmbedecktem Wellboden. Es wurden je Testreihe für Argon-Plasma und Argon-Plasma mit 1 % Sauerstoff acht Wells jeweils 1 min behandelt. Als Kontrolle wurden je acht Proben mit 5 slm Argongas behandelt.

Die Hohlelektroden-DBD besteht aus insgesamt 6 parallel angeordneten hohlen Metallröhren, die als Hochspannungselektroden dienen und in einem xyz-Verfahrtisch fixiert sind (Abb. 6). Die Mikrotiterplatte mit den biofilmbedeckten Wells steht auf einem geerdeten Peltier-Element, das die Gegenelektrode zu den Metallröhren bildet. Die Mikrotiterplatte fungiert hierbei als Dielektrikum. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein direktes Plasma. Beim Peltier-Element handelt es sich um zwei unterschiedlich dotierte Halbleiter, bei denen der Elektronenübergang zwischen den beiden Halbleiterplatten zur Abkühlung einer der Platten führt. Zur Plasmagenerierung wurde eine Spannung von 8,4 kV mit einer Frequenz von 37,6 kHz angelegt (Koban et al. 2010a). Das Trägergas, Argon bzw. Argon mit 1 % Sauerstoff, strömte mit einer Flussrate von 6 slm und damit 1 slm pro Well durch die Metallröhren in jeweils 6 Wells. Die Plasmabehandlung erfolgte in einem Abstand von 15 mm, die Behandlungszeit betrug 1 min.

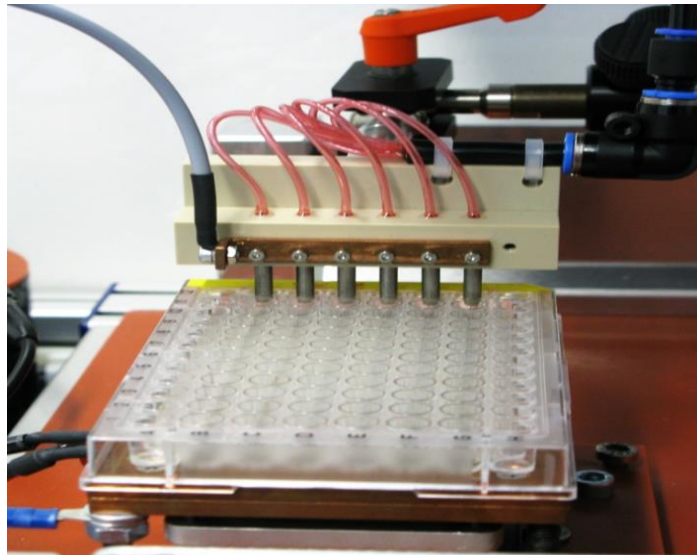


Abb. 6: Hohlelektroden-DBD im xyz-Verfahrtisch befestigt zur Behandlung der Erregersuspension oder von Biofilmen in einer 96-Well-MTP (aus: Koban et al. 2010a)

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Vorversuche

2.2.1.1 Korrelation der Vermehrungskurven bestimmt mittels OD bzw. KbE

Die optische Dichte korreliert mit den ermittelten Werten der KbE/ml (Tab. 3).

Tab. 3: KbE/ml-Werte von *C. albicans* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 9027 und *S. mutans* DSM 20523 in Korrelation zu den OD-Messwerten von 0,1, 0,4, 0,7 und 1,0 bei 600 nm

Test-Mikroorganismen	optische Dichte (OD ₆₀₀)			
	0,1	0,4	0,7	1,0
	KbE/ml			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6,518	6,859	7,324	7,617
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	7,633	8,905	8,985	9,05
<i>S. mutans</i> DSM 20523	6,681	7,059	7,198	-

2.2.1.2 Korrelation von OD und KbE bei unterschiedlichen Wellenlängen

Zur Ermittlung der Wellenlänge, bei der die optische Dichte und die KbE/ml möglichst gut korrelieren, wurden Messreihen mit dem Thermo Scientific Evolution 600 Spectrophotometer bei 540, 600 und 660 nm bis zu 24 h bei den Stämmen *C. albicans* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. mutans* DSM 20523 und *S. sanguinis* DSM 20068 durchgeführt.

Die Messküvetten wurden mit Startkonzentrationen von 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 KbE/ml bestückt und die Vermehrungsraten halbstündlich bestimmt. Eine Graphik, in der der Verlauf der Zellproliferation über 21 h anhand der OD-Werte in Abhängigkeit von der Wellenlänge und den entsprechenden KbE/ml-Werten aufgeführt ist, zeigt Abbildung 7 exemplarisch für *C. albicans* ATCC 10231.

Die anhand der OD-Werte erstellten Vermehrungskurven bei verschiedenen Wellenlängen (OD_{540nm}, OD_{600nm}, OD_{660nm}) unterscheiden sich geringfügig. Die OD nimmt hierbei mit kürzerer Wellenlänge zu (Abb.7).

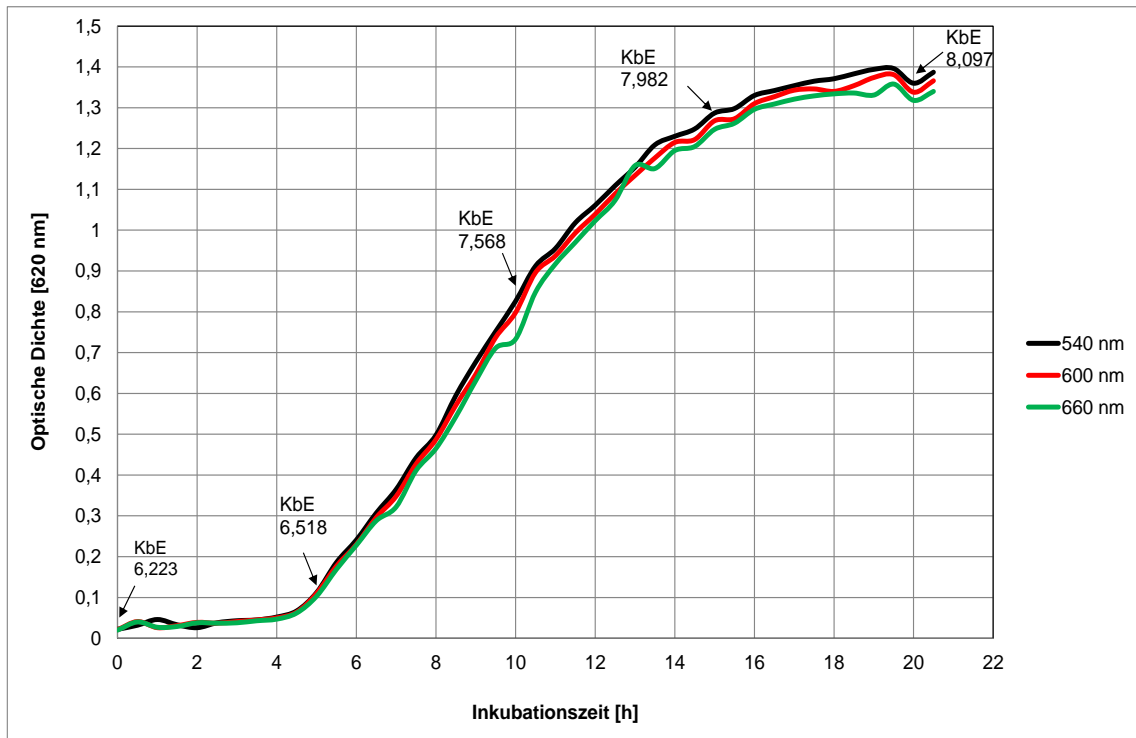


Abb. 7: Vermehrungskurven von *C. albicans* ATCC 10231 anhand der OD-Messwerte bei Wellenlängen von 540, 600 und 660 nm mit den zugehörigen KbE/ml-Angaben

2.2.1.3 Korrelation unterschiedlicher Verdünnungsstufen der KbE/ml mit der OD und dem Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase

Zur Ermittlung der Verdünnungsstufe, die in den Hauptversuchen Verwendung finden soll, wurde das Vermehrungsverhalten der Stämme *C. albicans* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. mutans* DSM 20523 und *S. sanguinis* DSM 20068 ausgehend von der Startkonzentration mit 10^6 KbE/ml und dekadischer Verdünnung zu den Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} untersucht.

Das Ergebnis wurde graphisch dargestellt. Alle Stämme lieferten vergleichbare Ergebnisse. Exemplarisch ist die Graphik für *C. albicans* ATCC 10231 in Abbildung 8 dargestellt. Aus ihr geht hervor, dass für jede weitere Verdünnungsstufe bis 10^{-3} ($10^0 = 10^6$ KbE/ml, $10^{-1} = 10^5$ KbE/ml, $10^{-2} = 10^4$ KbE/ml, $10^{-3} = 10^3$ KbE/ml) der Beginn der exponentiellen Vermehrung um je 2 h verzögert einsetzt. Die Vermehrungskurven verlaufen in der exponentiellen Phase parallel. Die OD-Werte in der Plateau-Phase unterscheiden sich im Wert um ca. 0,1.

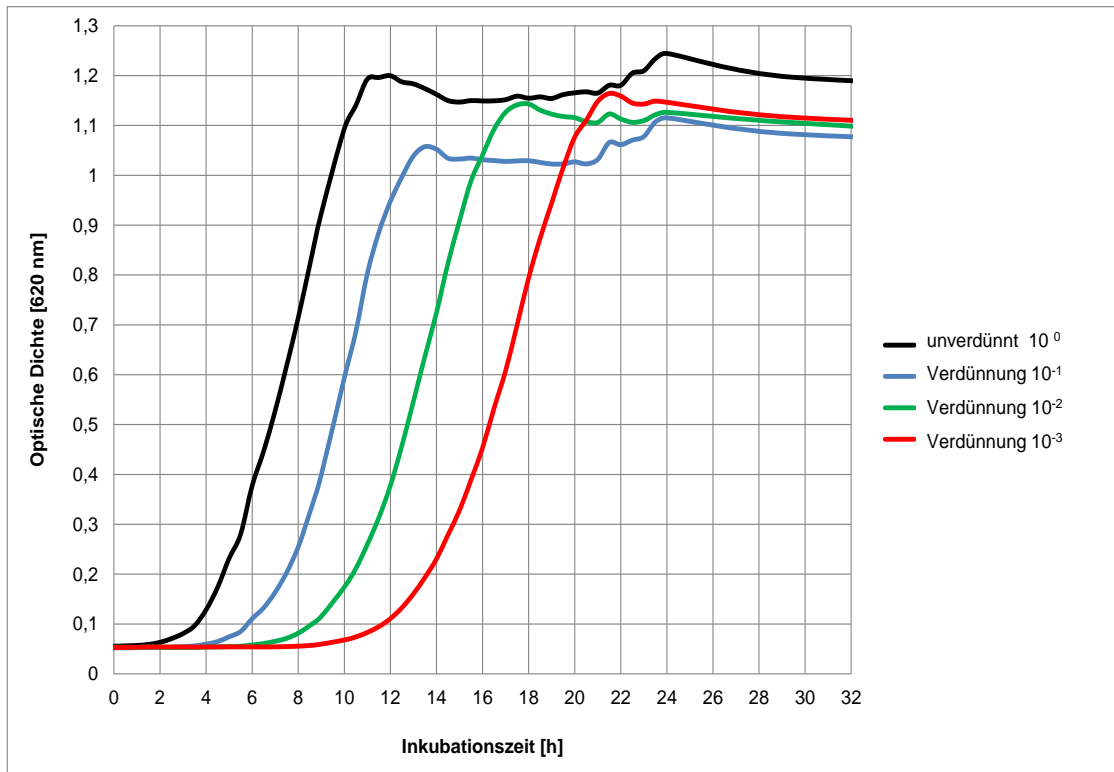


Abb. 8: Vermehrungskurven von *C. albicans* ATCC 10231 anhand der OD-Messwerte bei 620 nm für die Verdünnungsstufen 10^0 (10^6 KbE/ml), 10^{-1} (10^5 KbE/ml), 10^{-2} (10^4 KbE/ml) und 10^{-3} (10^3 KbE/ml)

2.2.2 Hauptversuche

Analyse der erstellten Vermehrungskurven mittels OD nach antiseptischer Behandlung: Der Verlauf der Vermehrung wurde über einen Zeitraum von 32 h in Diagrammen abgebildet. Die einzelnen Messwerte wurden hierbei zu einer Kurve verbunden. Jede Versuchsreihe wurde parallel mit sechs bis acht gleichen Proben durchgeführt. Die verwendeten Werte sind die Mittelwerte aus diesen parallel behandelten Proben.

Jede Versuchsreihe wird mit einer Tabelle, die alle Behandlungen in ihrem AUC-Wert aufsteigend auflistet, eingeleitet. Diese Tabellen geben einen Überblick darüber, welche Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Vermehrung gegenüber der Kontrolle führte.

Zusätzlich werden zu jeder Versuchsreihe zwei Diagramme abgebildet, die den Einfluss der Antiseptika- bzw. Plasmabehandlungen auf den zeitlichen Verlauf der Vermehrungskurven darstellen. Die Diagramme werden nach den folgenden Fragen abgehandelt:

- Um wie viel Stunden hat sich die exponentielle Vermehrungsphase im Vergleich zur Kontrolle verzögert?
- Zu welchen Zeitpunkten erreichen die Behandlungskurven die OD-Werte der Kontrolle?
- In welchen Zeiträumen liegen die OD-Werte der Behandlungskurven über oder unter den Werten der Kontrolle?
- Zu welchem Zeitpunkt wird die maximale OD erreicht?

Die ausführliche Diagrammbeschreibung wird abschließend durch eine Tabelle ergänzt, die die im Fließtext nur teilweise eingearbeiteten Verlaufsdaten enthält und somit einen zusammenfassenden Überblick gibt.

2.2.2.1 *C. albicans* ATCC 10231

Bis auf die Anwendung von PHMB 0,0001 % mit einem AUC-Wert von 20,73 weisen alle Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle (AUC = 20,91) einen signifikant geringeren AUC-Wert auf (Tab. 4). Bei der Ar-Gas-Behandlung mit dem kINPen09[®] wurde kein Wert ermittelt.

Tab. 4: Einfluss von CHX, PHMB und OCT bei Einwirkung bis 32 h bzw. von 1 min Exposition mit Argonplasma (Ar-P) und Argongas (Gaskontrolle, Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1% Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD auf die Kultur von *C. albicans* ATCC 10231 anhand der AUC-Werte der ermittelten Vermehrungskurven bis 32 h (\bar{x} : Mittelwert, SD: Standardabweichung, p-Wert)

Behandlung	AUC ($\bar{x} \pm SD$)	p
Kontrolle	20,91 ± 0,51	
OCT 0,0002 %	1,82 ± 0,09	0,001*
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	1,98 ± 0,05	0,003*
HDBD-Ar-P	1,98 ± 0,09	0,007*
kINPen09 [®] -Ar-P	2,14 ± 0,31	0,001*
kINPen09 [®] -Ar-G	-	-
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -P	4,16 ± 3,09	0,002*
OCT 0,00005 %	7,53 ± 2,91	0,001*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -G	9,75±1,43	0,002*
HDBD-Ar-G	13,30±0,71	0,002*
CHX 0,0001 %	17,10±0,99	0,001*
CHX 0,00000625 %	17,29±0,99	0,001*
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	18,09±1,07	0,002*
PHMB 0,000025 %	19,95±0,79	0,016*
PHMB 0,0001 %	20,73±1,31	0,674

*signifikant (p<0,05) zur unbehandelten Kontrolle

Einfluss der Antiseptika im zeitlichen Verlauf: Die Behandlung mit CHX 0,0001 % und CHX 0,00000625 % (Abb. 9) verzögert den Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase von *C. albicans* um etwa 2 h im Vergleich zur Kontrolle. Nach 29,5 h erreicht CHX 0,0001 % und CHX 0,00000625 % eine OD_{max} von 1,09 bzw.1,01. Beide CHX-Konzentrationen erreichen nach 16,5 h die Plateau-Phase bei einer OD von 0,96, was im Mittel etwa der Plateau-Phase der Kontrolle entspricht. Hierbei sind die OD-Werte beider Konzentrationen zwischen dem Inkubationszeitraum von 16,5 h bis ca. 24 h größer, außerhalb dieses Zeitraums kleiner als die der Kontrolle.

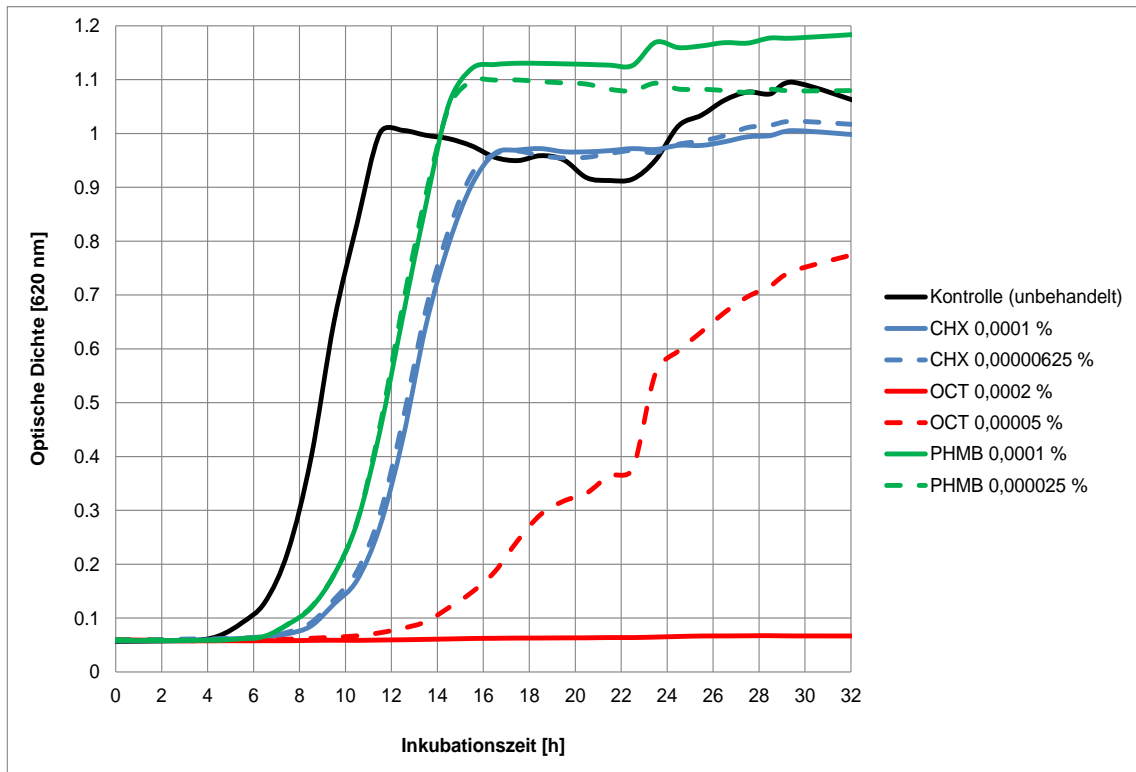


Abb. 9: Vermehrungskurven anhand der OD von *C. albicans* ATCC 10231 bei Einwirkung der Antiseptika CHX, PHMB und OCT über 32 h in jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen sowie der unbehandelten Kontrolle

Die Konzentration von OCT mit 0,0002 % (Abb. 9) erzielt während der gesamten Inkubationszeit mit einer nahezu konstanten OD von 0,06 eine vollständige Vermehrungshemmung. Die Latenzphase der niedrigeren Konzentration des OCT mit 0,00005 % beträgt 7 h, so dass die exponentielle Vermehrungsphase etwa 3 h später als die der Kontrolle beginnt. Nach 22,5 h Inkubationszeit ist ein deutlicher Vermehrungsschub erkennbar. Dadurch wird nach 32 h eine OD_{max} von 0,78 erreicht. Die OD-Werte beider Konzentrationen liegen während der gesamten Inkubationszeit signifikant unter den Werten der Kontrolle.

Die Latenzphase wird durch die Behandlung mit PHMB 0,0001 %ig und 0,000025 %ig ca. 2 h im Vergleich zur Kontrolle verzögert (Abb. 9). Bei beiden Konzentrationen wird nach ca. 14 h mit 2,5 h Verzögerung der Wert der Kontrolle erreicht. Bei Einwirkung von 0,0001 % PHMB sind die OD-Werte nach 14 h stets größer als bei der Kontrolle. Die OD-Werte der niedrigeren PHMB-Konzentration von 0,000025 % sind im Zeitraum von 14 h bis 28 h und 31 h bis 32 h größer als die OD-Werte der Kontrolle. Bei der höheren Konzentration wird nach 32 h eine OD_{max} von 1,17 erreicht. Bei Einwirkung von PHMB 0,000025 % ergibt sich eine OD_{max} von 1,1 nach 16 h.

Einfluss von Plasma im zeitlichen Verlauf: Bei der HDBD mit Argonplasma (HDBD-Ar-P) beginnt die exponentielle Phase mit einer Verzögerung von 21,5 h im Vergleich zur Kontrolle, wobei eine OD_{max} von 0,11 erreicht wird (Abb. 10). Die Vermehrung wurde durch die HDBD mit Ar+1 % O_2 -P über die gesamte Inkubationszeit komplett mit einer durchschnittlichen OD von 0,06 gehemmt. Die zugehörigen Gaskontrollen verzögern den Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase um ca. 4 h (HDBD-Ar+1 % O_2 -G) bzw. 6 h (HDBD-Ar-G) im Vergleich zur Kontrolle und erreichen eine OD_{max} von 0,99 (HDBD-Ar+1 % O_2 -G) nach 28,5 h bzw. von 0,88 (HDBD-Ar-G) nach 32 h Inkubationszeit. Bei HDBD-Ar+1 % O_2 -G werden im Zeitraum nach 21,5 h bis 22,5 h Inkubationszeit die OD-Werte der Kontrolle erreicht. Die OD-Werte von HDBD-Ar-P, HDBD-Ar-G und HDBD-Ar+1 % O_2 -P liegen über dem gesamten Inkubationszeitraum signifikant unter den Werten der Kontrolle. Gleiches gilt für HDBD-Ar+1 % O_2 -G mit Ausnahme des Zeitraums von 21,5 h bis 22,5 h.

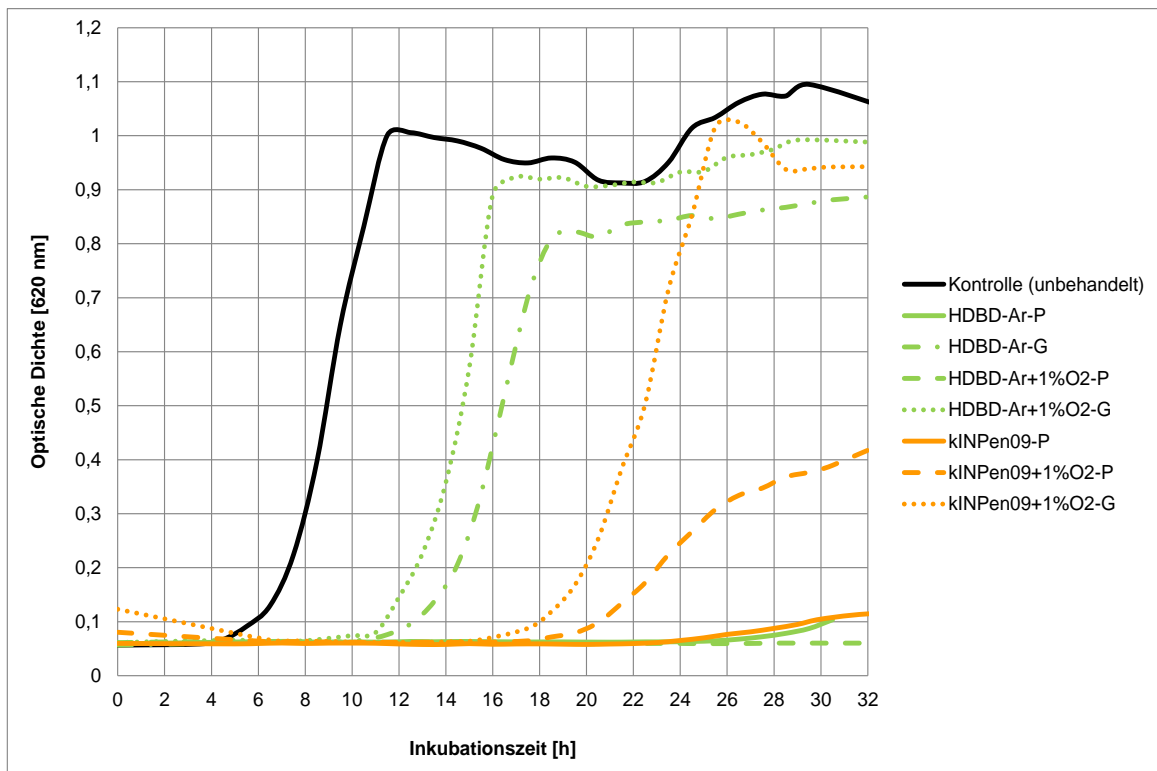


Abb. 10: Vermehrungskurven anhand der OD von *C. albicans* ATCC 10231 nach Einwirkung von 1 min Argonplasma (Ar-P) bzw. Argongas (Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff (+1 % O_2) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD sowie der unbehandelten Kontrolle

Durch den kINPen09[®] mit Ar-P (hier ist keine Gaskontrolle vorhanden) wird die Vermehrung bis ca. 25,5 h Inkubationszeit mit einem konstanten OD-Wert von ca. 0,06

nahezu vollständig gehemmt. Die verzögerte Vermehrungsphase beginnt nach ca. 24 h und erreicht eine OD_{max} von 0,12 (Tab. 5) nach 32 h Inkubationszeit, wobei sich die OD-Werte stets signifikant unter den Werten der Kontrolle befinden.

Durch 1 % Sauerstoffzumischung zum Argonplasma beim kINPen09® wird die Vermehrung um ca. 13,5 h im Vergleich zur Kontrolle verzögert und eine OD_{max} von 0,42 erreicht. Bei der Gaskontrolle Ar+1 % O₂ beim kINPen09® ist die exponentielle Vermehrungsphase um ca. 11 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verzögert und erreicht einen maximalen OD-Wert von 1,03 mit anschließendem Abfall (Abb. 10).

Überblick zu den Verlaufsdaten: In Tabelle 5 werden die zur Analyse verwendeten Werte und Charakteristika der Vermehrungskurven der verschiedenen Antiseptika- und Plasmabehandlungen von *C. albicans* ATCC 10231 gegenübergestellt. Aus Tabelle 5 ist unter anderem ersichtlich, dass die Behandlung mit OCT 0,0002 % und HDBD-Ar+1 % O₂-P zu einer vollständigen Vermehrungshemmung führt. Der Beginn der exponentiellen Phase ist bei allen Behandlungen verzögert. Die maximale OD beider PHMB-Konzentrationen liegt über der der Kontrolle.

Tab. 5: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *C. albicans* ATCC 10231 mit Antiseptika bzw. Plasma anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD_{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	4	-	-	-	29,5	1,09
CHX 0,0001 %	6	-	16,5 24	0,96 0,97	29,5	1,01
CHX 0,00000625 %	6	-	16,5 24	0,96 0,97	29,5	1,02
OCT 0,0002 %	-	+	-	-	-	0,06
OCT 0,00005 %	7	-	-	-	32	0,78
PHMB 0,0001 %	6	-	14	0,99	32	1,17
PHMB 0,000025 %	6	-	14 28 29 31	0,99 1,07 1,07 1,06	16	1,10
HDBD-Ar-P	25,5	-	-	-	32	0,11
HDBD-Ar-G	10	-	-	-	32	0,88
HDBD-Ar + 1 % O_2 -P	-	+	-	-	-	0,06
HDBD-Ar + 1 % O_2 -G	8	-	21,5 22 22,5	0,92 0,92 0,92	28,5	0,99
kINPen09 [®] -Ar-P	24	-	-	-	32	0,12
kINPen09 [®] -Ar-G	-	-	-	-	-	-
kINPen09 [®] -Ar + 1 % O_2 -P	17,5	-	-	-	26	1,03
kINPen09 [®] -Ar + 1 % O_2 -G	15	-	-	-	26	1,03

2.2.2.2 *C. albicans* SC 5314

Bis auf den kINPen09[®]-Ar-G mit einem AUC-Wert von 13,59 weisen alle Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle (AUC = 21,17) einen signifikanten Einfluss auf die Reduktion des AUC-Werts auf (Tab. 6).

Tab. 6: Einfluss von CHX, PHMB und OCT bei Einwirkung bis 32 h bzw. von 1 min Exposition mit Argonplasma (Ar-P) und Argongas (Gaskontrolle, Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1% Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD auf die Kultur von *C. albicans* SC 5314 anhand der AUC-Werte der ermittelten Vermehrungskurven bis 32 h (\bar{x} : Mittelwert, SD: Standardabweichung, p-Wert)

Behandlung	AUC ($\bar{x} \pm SD$)	p
Kontrolle (unbehandelt)	21,17 ± 0,51	
OCT 0,0002 %	1,81 ± 0,09	0,001*
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	2,05 ± 0,12	0,002*
kINPen09 [®] -Ar-P	4,77 ± 3,28	0,001*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -P	5,10 ± 2,84	0,002*
HDBD-Ar-P	6,33 ± 5,98	0,002*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -G	6,44 ± 3,14	0,002*
HDBD-Ar-G	13,36 ± 1,02	0,002*
kINPen09 [®] -Ar-G	13,59 ± -	0,121
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	17,00 ± 1,57	0,002*
PHMB 0,000025 %	17,32 ± 0,48	0,001*
CHX 0,00000625 %	17,59 ± 1,09	0,001*
PHMB 0,0001 %	17,80 ± 0,83	0,001*
OCT 0,00005 %	18,04 ± 0,74	0,001*
CHX 0,0001 %	18,90 ± 0,77	0,001*

*signifikant (p<0,05) zur unbehandelten Kontrolle

Einfluss der Antiseptika im zeitlichen Verlauf: In Abbildung 11 wird deutlich, dass die Behandlung mit OCT 0,0002 % mit einer konstanten OD von 0,06 zu einer vollständigen Vermehrungshemmung führt. Die exponentielle Phase beider Konzentrationen von CHX und PHMB sowie von OCT mit 0,00005 % beginnt etwa 2,5 h später als die der Kontrolle. Bei beiden Konzentrationen von PHMB und CHX mit 0,0001 % sowie von OCT 0,00005 % wird nach ca. 16 h, mit einer Verzögerung von ca. 4 h der OD-Wert der Kontrolle in Höhe von 1 erreicht. Die OD_{max}-Werte betragen für CHX 0,0001 % nach 18 h 1,13, für PHMB 0,0001 % nach 29 h 1,07 und für OCT 0,00005 % nach 30 h 1,09. Die OD-Werte der drei genannten Behandlungen liegen nach ca. 16 h Inkubationszeit stets über den OD-Werten der Kontrolle.

Bei Einwirkung der niedrigeren PHMB-Konzentration von 0,000025 % wird nach 24,5 h Inkubationszeit der OD-Wert der Kontrolle erreicht (Abb. 11). Zuvor erreicht sie bei

18 h ihr OD_{max} von 1,02. Die OD-Werte liegen außerhalb des Zeitraums von 16,5 h und 24,5 h stets unter den OD-Werten der Kontrolle.

Bei Einwirkung von CHX 0,00000625 % wird nach 17 h, 26 h, 27,5 h, 28,5 h und 32 h der Wert der Kontrolle erreicht (Abb. 11). Dabei liegen die OD-Werte im Inkubationszeitraum zwischen 17 h und 26 h über denen der Kontrolle. Die OD_{max} wird mit 1,08 nach 18,5 h Inkubationszeit erreicht. Bei Einwirkung von CHX 0,0001 % liegt die OD_{max} nach 18 h bei 1,13.

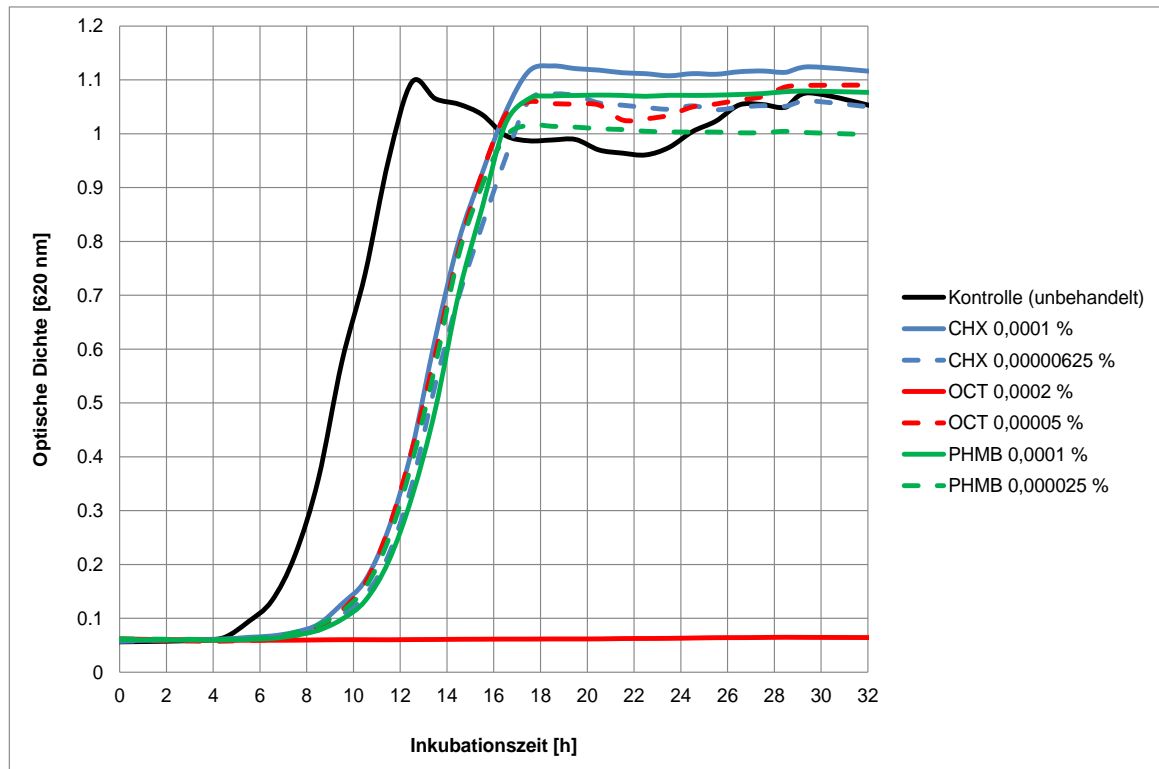


Abb. 11: Vermehrungskurven anhand der OD von *C. albicans* SC 5314 bei Einwirkung der Antiseptika CHX, PHMB und OCT über 32 h in jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen sowie der unbehandelten Kontrolle

Einfluss von Plasma im zeitlichen Verlauf: Die HDBD mit Argon Plasma induziert eine lag-Phase von ca. 11 h mit einer maximalen OD von 0,5 (Abb. 12). Die exponentielle Phase verzögert sich um 6,5 h im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Gaskontrolle beginnt die exponentielle Phase 5,5 h später als bei der Kontrolle und erreicht nach 31 h Inkubationszeit eine OD_{max} von 0,86.

Durch die HDBD mit Ar+1 % O_2 -P wird die Vermehrung über die gesamte Inkubationszeit bei einer konstanten OD von 0,06 gehemmt. In der Gaskontrolle ist die Vermehrung um 3,5 h im Vergleich zur Kontrolle verzögert. Bei der Gaskontrolle wird

nach 32 h Inkubationszeit eine OD_{max} von 0,96 erreicht und die exponentielle Phase beginnt 3,5 h später als die der Kontrolle. Die OD-Werte aller Behandlungen mit HDBD liegen zu jedem Zeitpunkt unter den Werten der unbehandelten Kontrolle.

Nach Einwirkung des kINPen09[®] mit Ar-P beginnt die exponentielle Vermehrungsphase nach einer Inkubationszeit von ca. 17 h. Nach 32 h wird die maximale OD von 0,46 erreicht (Abb. 12). Die OD-Werte verlaufen über den gesamten Inkubationszeitraum unter denen der Kontrolle. In der Gaskontrolle des kINPen09[®] mit Ar-Gas ist die Vermehrung im Vergleich zur Kontrolle um 11,5 h verzögert und erreicht den OD-Wert der Kontrolle ca. 12 h später. Ab diesem Zeitpunkt befinden sich die OD-Werte stets über den OD-Werten der Kontrolle.

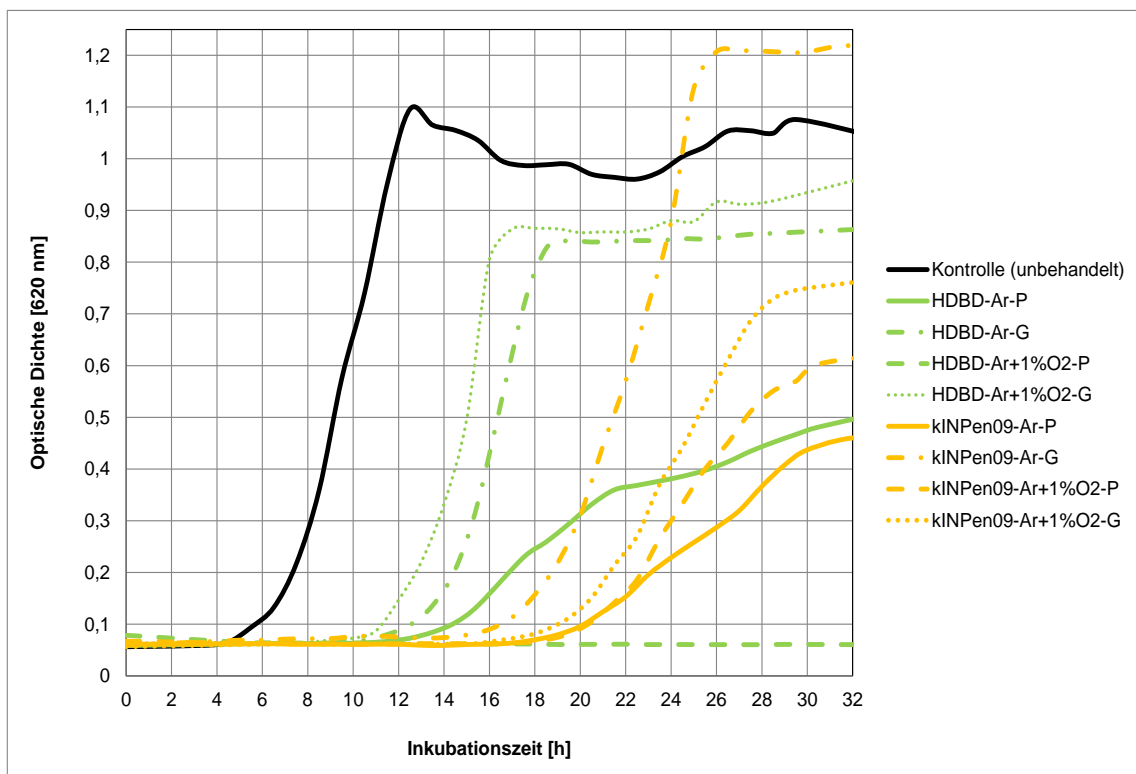


Abb. 12: Vermehrungskurven anhand der OD von *C. albicans* SC 5314 nach Einwirkung von 1 min Argonplasma (Ar-P) bzw. Argongas (Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD sowie der unbehandelten Kontrolle

Durch die Zugabe von 1 % Sauerstoff zum Argon beim kINPen09[®] verzögert sich die exponentielle Phase um 11,5 h im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 12). Gleiches gilt für die Gaskontrolle. Weiterhin sind die OD-Werte beider Vermehrungsverläufe stets kleiner als die der Kontrolle. Beide erreichen nach einer Inkubationszeit von 32 h als

maximale OD-Werte 0,62 (kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-P) bzw. 0,76 (kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-G).

Überblick zu den Verlaufsdaten: In Tabelle 7 werden die zur Analyse verwendeten Werte und Charakteristika der Vermehrungskurven der verschiedenen Antiseptika- und Plasmabehandlungen von *C. albicans* SC 5314 gegenübergestellt. Hieraus geht hervor, dass OCT 0,0002 % und HDBD-Ar+1 % O₂-P zu einer vollständigen Vermehrungshemmung führen. Die Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase erstreckt sich bei den TTP-Untersuchungen für die restlichen Behandlungen mit HDBD zwischen 3,5 h und 6,5 h und für die kINPen09[®]-Behandlungen zwischen 10,5 h und 12,5 h. Die restlichen Antiseptikabehandlungen verzögerten die Vermehrung um 2,5 h im Vergleich zur Kontrolle. Die höchste maximale OD erreicht CHX 0,0001 % mit 1,13 und übersteigt damit die der Kontrolle.

Tab. 7: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *C. albicans* SC 5314 mit Antiseptika bzw. Plasma anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD _{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	4,5	-	-	-	12,5	1,1
CHX 0,0001 %	7	-	16	1,1	18	1,13
CHX 0,00000625 %	7	-	17 26 27,5 28,5 32	0,99 1,04 1,05 1,05 1,05	18,5	1,08
OCT 0,0002 %	-	+	-	-	-	0,06
OCT 0,00005 %	7	-	16	1	30	1,09
PHMB 0,0001 %	7	-	16,5	1	29	1,07
PHMB 0,000025 %	7	-	16,5 24,5	0,99 1	18	1,02
HDBD-Ar-P	11	-	-	-	32	0,50
HDBD-Ar-G	10	-	-	-	31	0,86
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	-	+	-	-	-	0,60
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	8	-	-	-	32	0,96
kINPen09® - Ar-P	17	-	-	-	32	0,46
kINPen09® - Ar-G	15	-	24,5	1	31	1,22
kINPen09® - Ar+1 % O ₂ -P	16	-	-	-	32	0,62
kINPen09® - Ar+1 % O ₂ -G	16	-	-	-	32	0,76

2.2.2.3 *P. aeruginosa* ATCC 9027

Alle Behandlungen weisen im Vergleich zur Kontrolle (AUC = 24,42) einen signifikanten Einfluss auf die Reduktion des AUC-Werts auf (Tab. 8). Bei diesem Erreger hat keine Plasmabehandlung stattgefunden.

Tab. 8: Einfluss von CHX, PHMB und OCT auf die Kultur von *P. aeruginosa* ATCC 9027 bei Einwirkung bis 32 h anhand der AUC-Werte der ermittelten Vermehrungskurven bis 32 h (\bar{x} : Mittelwert, SD: Standardabweichung, p-Wert)

Behandlung	AUC ($\bar{x} \pm SD$)	p
Kontrolle (unbehandelt)	24,42 \pm 0,28	
OCT 0,0002 %	18,43 \pm 0,77	0,001*
CHX 0,0001 %	21,66 \pm 0,37	0,001*
CHX 0,00000625 %	22,18 \pm 0,67	0,001*
PHMB 0,0001 %	22,62 \pm 0,16	0,001*
PHMB 0,000025 %	22,77 \pm 0,20	0,001*
OCT 0,00005 %	22,77 \pm 0,07	0,001*

*signifikant ($p < 0,05$) zur unbehandelten Kontrolle

Einfluss der Antiseptika im zeitlichen Verlauf: Die zwei CHX - Konzentrationen verzögern die exponentielle Vermehrungsphase um 2,5 h im Vergleich zur Kontrolle und erreichen nach 17,5 h bzw. 23,5 h Inkubationszeit ihre OD_{max} von 1,22 (CHX 0,0001 %) bzw. 1,26 (CHX 0,00000625 %) (Abb. 13). Beide Konzentrationen erreichen mehrmals nach ca. 15,5 h Inkubationszeit OD-Werte der Kontrollkurve (Tab. 9).

Durch Einwirkung von OCT 0,0002 % wird die Vermehrung um 4 h verzögert. Die OD_{max} von 1,19 wird nach 26,5 h Inkubation erreicht. Jedoch erreicht sie zu keinem Zeitpunkt die OD-Werte der Kontrolle (Abb. 13). Bei der Einwirkung der niedrigeren OCT-Konzentration von 0,00005 % ergibt sich im Vergleich zur Kontrolle eine Vermehrungsverzögerung von 2 h. Die OD-Werte der Kontrolle werden nach der Inkubationszeit von 13,5 h wiederholt erreicht (Tab. 9). Die OD_{max} beträgt nach 21,5 h Inkubation 1,21.

Bei beiden Konzentrationen von PHMB ergibt sich eine Vermehrungsverzögerung von ca. 2,5 h im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13). Nach 13,5 h Inkubationszeit erreicht PHMB mit beiden Konzentrationen öfter die OD-Werte der Kontrolle (Tab. 9). PHMB 0,0001 % erreicht zum Zeitpunkt 26,5 h eine OD_{max} von 1,22. Die OD_{max} von PHMB 0,000025 % beträgt nach 26,5 h Inkubation 1,24.

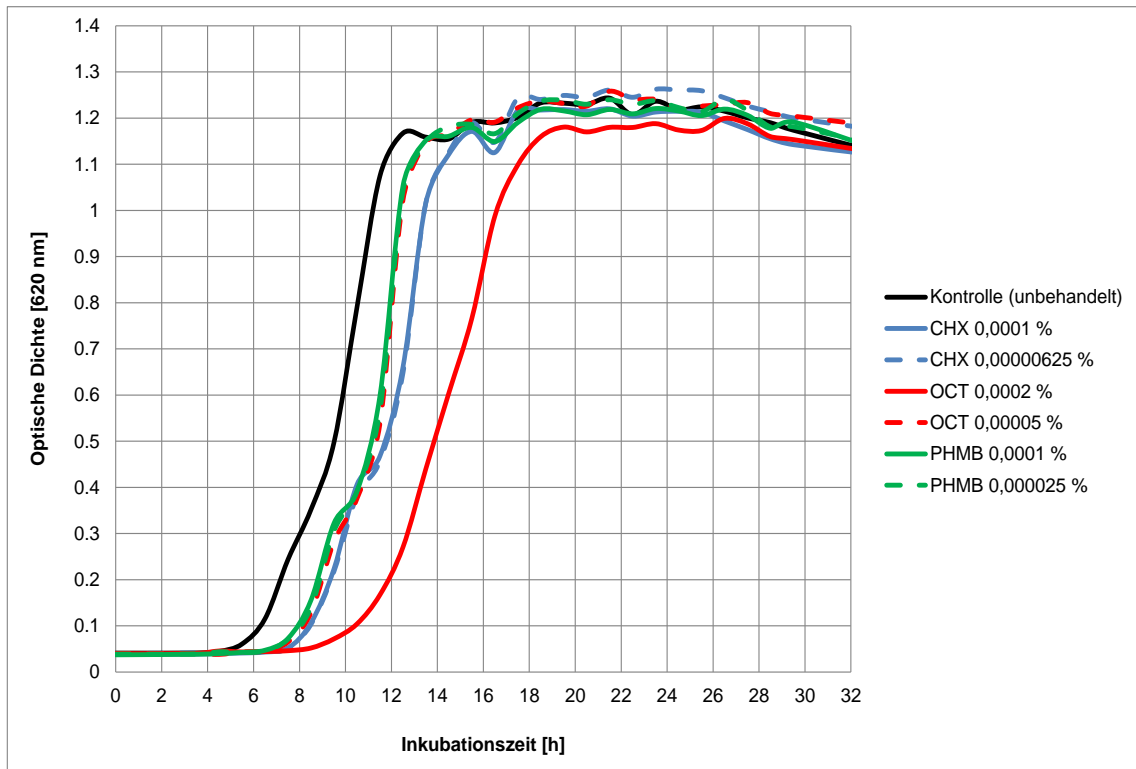


Abb. 13: Vermehrungskurven anhand der OD von *P. aeruginosa* ATCC 9027 bei Einwirkung der Antiseptika CHX, PHMB und OCT über 32 h in jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen sowie der unbehandelten Kontrolle

Überblick zu den Verlaufsdaten: In Tabelle 9 werden die zur Analyse verwendeten Werte und Charakteristika der Vermehrungskurven der verschiedenen Antiseptikabehandlungen von *P. aeruginosa* ATCC 9027 gegenübergestellt. Der Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase wurde durch OCT 0,00005 % und die CHX- und PHMB-Konzentrationen um ca. 2 h verzögert. Die maximale OD dieser Behandlungen entspricht dann der der Kontrolle. Der Beginn der exponentiellen Phase wird von OCT 0,0002 % um 4 h verzögert. Die maximale OD bleibt mit 1,19 leicht unter dem Wert der Kontrolle.

Tab. 9: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *P. aeruginosa* ATCC 9027 mit Antiseptika anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD _{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	4,5	-	-	-	21,5	1,23
CHX 0,0001 %	7	-	15,5 18 22,5 24,5	1,2 1,23 1,21 1,22	17,5	1,22
CHX 0,00000625 %	7	-	15,5 17 18,5	1,18 1,19 1,24	23,5	1,26
OCT 0,0002 %	8,5	-	-	-	26,5	1,19
OCT 0,00005 %	6,5	-	13,5 16,5 19 20,5	1,15 1,19 1,23 1,23	21,5	1,26
PHMB 0,0001 %	6,5	-	13,5 15,5 22,5 27,5 29	1,15 1,17 1,21 1,2 1,17	23,5	1,22
PHMB 0,000025 %	6,5	-	13,5 15,5 17,5	1,15 1,17 1,2	26,5	1,24

2.2.2.4 *P. aeruginosa* SG 81

Bis auf die Behandlung mit dem kINPen09[®]-Ar-G und der HDBD-Ar+1 % O₂-G mit einem AUC-Wert von 16,65 weisen alle Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle (AUC-Wert 16,4) einen signifikanten Einfluss auf die Reduktion des AUC-Werts auf (Tab. 10).

Tab. 10: Einfluss von CHX, PHMB und OCT bei Einwirkung bis 32 h bzw. von 1 min Exposition mit Argonplasma (Ar-P) und Argongas (Gaskontrolle, Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1% Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD auf die Kultur von *P. aeruginosa* SG 81 anhand der AUC-Werte der ermittelten Vermehrungskurven bis 32 h (\bar{x} : Mittelwert, SD: Standardabweichung, p-Wert)

Behandlung	AUC ($\bar{x} \pm$ SD)	p
Kontrolle (unbehandelt)	16,40 \pm 0,58	
kINPen09 [®] -Ar-P	3,26 \pm 2,41	0,001*
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	4,68 \pm 0,12	0,002*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -P	6,65 \pm 2,86	0,002*
HDBD-Ar-P	7,80 \pm 1,93	0,002*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -G	8,06 \pm 0,17	0,002*
OCT 0,0002 %	10,23 \pm 0,62	0,001*
kINPen09 [®] -Ar-G	10,73 \pm -	0,121
HDBD-Ar-G	12,69 \pm 0,14	0,002*
CHX 0,0001 %	13,46 \pm 0,32	0,001*
CHX 0,00000625 %	13,48 \pm 0,39	0,001*
PHMB 0,000025 %	13,98 \pm 0,68	0,001*
PHMB 0,0001 %	13,98 \pm 0,57	0,001*
OCT 0,00005 %	14,93 \pm 0,46	0,001*
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	16,65 \pm 0,94	1,000

*signifikant (p<0,05) zur unbehandelten Kontrolle

Einfluss der Antiseptika im zeitlichen Verlauf: Bei der Behandlung mit den CHX-Konzentrationen verzögert sich im Vergleich zur Kontrolle die exponentielle Vermehrungsphase um 5 h (Abb. 14). Nach 21 h und nach ca. 27 h erreicht CHX mit 0,0001 % die OD-Werte der Kontrolle. Im Inkubationszeitraum von 21 h bis 27 h sind die OD-Werte stets höher als die der Kontrolle. Die OD_{max} beträgt nach 27,5 h Inkubationszeit 1,12. Die OD-Werte der niedrigeren Konzentration CHX 0,00000625 % gleichen sich nach ca. 21,5 h und 28,5 h denen der Kontrolle an. Zwischen 21,5 h und

28,5 h liegen die OD-Werte höher als die Werte der Kontrolle. Nach 28 h Inkubationszeit ergibt sich eine OD_{max} von 1,15.

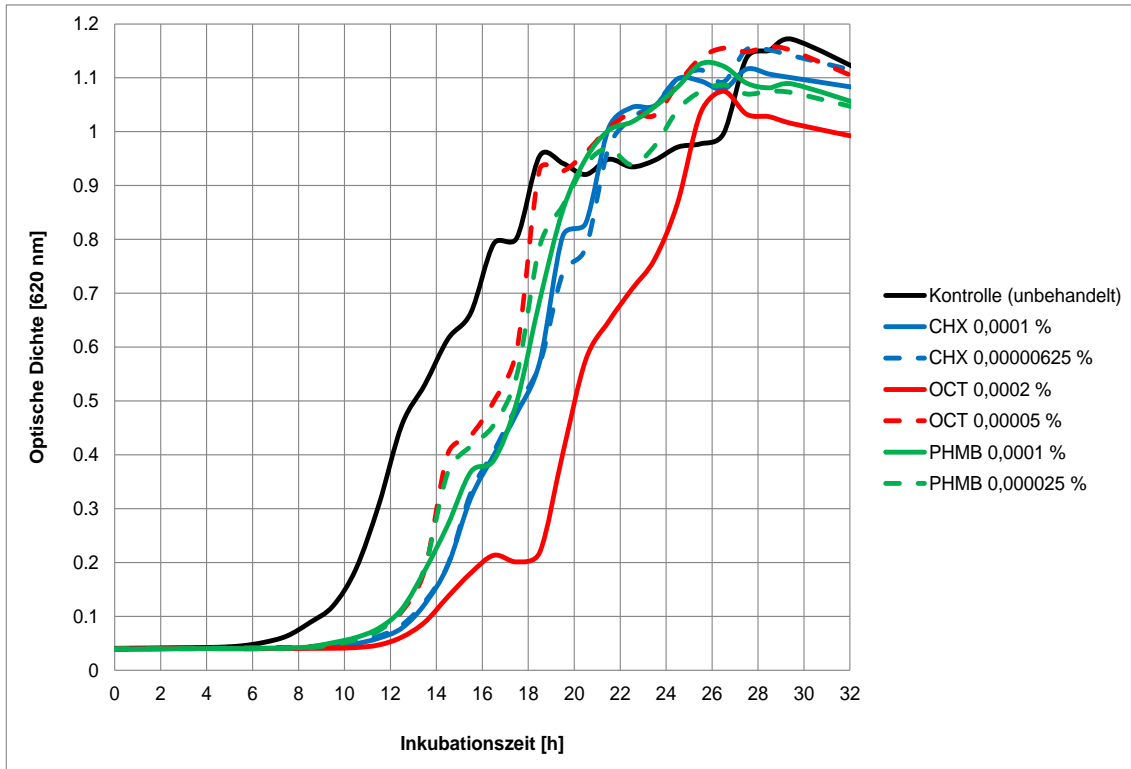


Abb. 14: Vermehrungskurven anhand der OD von *P. aeruginosa* SG 81 bei Einwirkung der Antiseptika CHX, PHMB und OCT über 32 h in jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen sowie der unbehandelten Kontrolle

Die Kurven von OCT 0,0002 %ig und OCT 0,00005 %ig erreichen nach 26,5 h Inkubationszeit ihre maximale OD von 1,08 bzw. 1,15. Dabei beginnen die Vermehrungsphasen 6 h bzw. 3,5 h später als die der Kontrolle (Abb. 14). Die höhere Konzentration übersteigt die OD-Werte der Kontrolle im Bereich von 25 h bis 27 h. Gleiches gilt für die niedrigere Konzentration im Inkubationszeitraum von 20 h bis ca. 28 h.

Bei der Anwendung der PHMB-Konzentrationen ergibt sich eine Vermehrungsverzögerung von 3,5 h im Vergleich zur Kontrolle. Beide Behandlungen übersteigen im Zeitraum von ca. 20 h bis 27 h die OD-Werte der Kontrolle (Abb. 14). Die maximalen OD-Werte werden für PHMB 0,0001 % nach 25,5 h bei 1,13 und für PHMB 0,000025 % nach 26,5 h erreicht.

Einfluss von Plasma im zeitlichen Verlauf: Bei der HDBD mit Ar-P beginnt die exponentielle Vermehrungsphase 8 h später als bei der Kontrolle und 3 h später als bei

der Gaskontrolle. Die OD_{max} erreicht die HDBD mit Ar-P wie ihre Gaskontrolle nach 32 h Inkubationszeit bei einem Wert von 0,94 bzw. 1,07. Während der HDBD Behandlung mit Ar-P liegen die OD-Werte stets unter denen der Kontrolle (Abb. 15). Gleiches gilt, mit Ausnahme des Zeitraums von 24 h bis 27 h, für die Gaskontrolle.

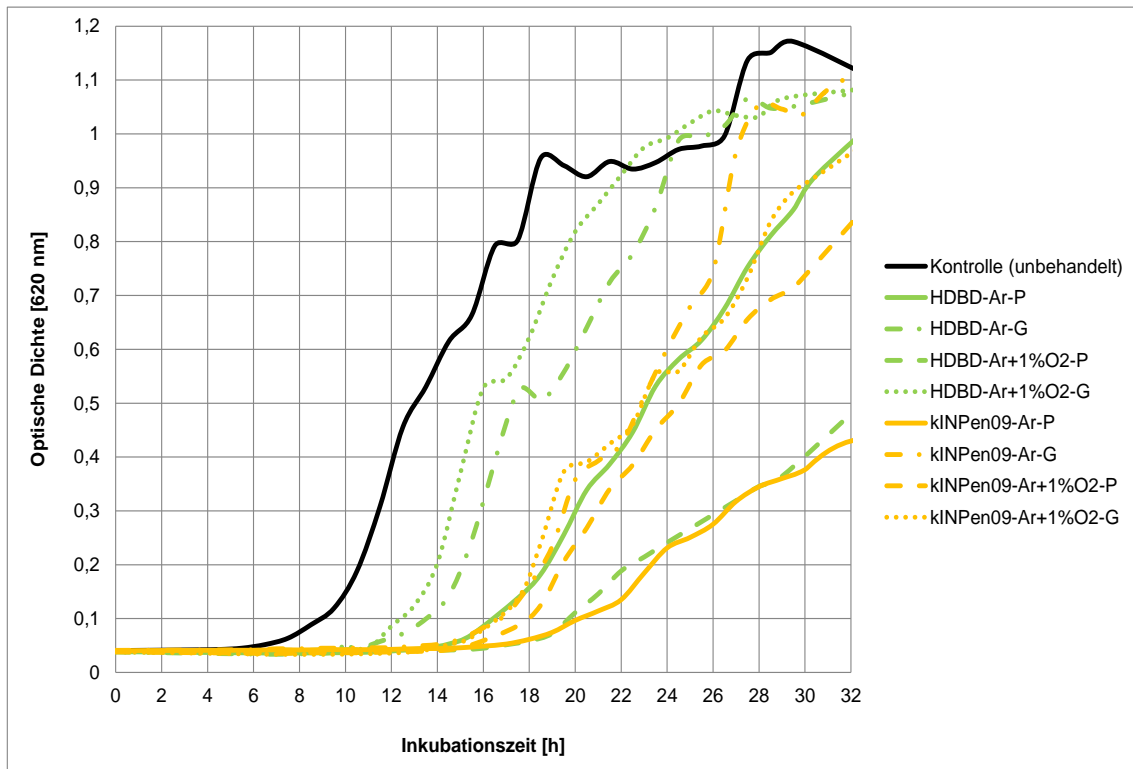


Abb. 15: Vermehrungskurven anhand der OD von *P. aeruginosa* SG 81 nach Einwirkung von 1 min Argonplasma (Ar-P) bzw. Argongas (Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD sowie der unbehandelten Kontrolle

Durch Zumischung von 1 % Sauerstoff bei der HDBD mit Ar-P startet die Vermehrung 10 h später im Vergleich zur Kontrolle. Die Vermehrungsverzögerung der Gaskontrolle beginnt 4 h später als die der Kontrolle (Abb. 15). Beide erreichen nach der Inkubationszeit von 32 h ihre OD_{max} von 0,47 bzw. 1,07.

Bei der HDBD-Ar+1 % O₂-P sind die OD-Werte stets geringer als die der Kontrolle. Die Gaskontrolle übersteigt in der Zeit von ca. 22,5 h bis 27 h die Kontrolle.

Bei dem kINPen09[®] mit Ar-P beginnt die Vermehrung 10 h später im Vergleich zur Kontrolle und 1 h später als die Gaskontrolle. Beide weisen über den gesamten Zeitraum kleinere OD-Werte als die Kontrolle auf und erreichen nach 32 h Inkubationszeit ihr Maximum bei 0,43 bzw. bzw. 1,1 (Abb. 15).

Durch die Zumischung von 1 % Sauerstoff verkürzt sich die Vermehrungsverzögerung um 1 h im Vergleich zum kINPen09[®]-Ar-P. Die Gaskontrolle verkürzt die Verzögerung um eine weitere Stunde, sodass die exponentielle Vermehrungsphase 8 h später beginnt als die der unbehandelten Kontrolle. Beide erreichen ihre OD_{max} nach 32 h, bei dem kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-P mit 0,84 und deren Gaskontrolle mit 0,96.

Überblick zu den Verlaufsdaten: In Tabelle 11 werden die zur Analyse verwendeten Werte und Charakteristika der Vermehrungskurven der verschiedenen Antiseptika- und Plasmabehandlungen von *P. aeruginosa* SG 81 gegenübergestellt. Aus ihr ist ersichtlich, dass die niedrigsten OD-Werte vom kINPen09[®]-Ar-P mit 0,43 und von der HDBD-Ar+1 % O₂-P mit 0,47 erreicht werden. Die höchsten OD-Werte knapp unterhalb der Kontrolle wurden von CHX 0,0000625 % und OCT 0,00005 % bei 1,15 erreicht.

Tab. 11: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *P. aeruginosa* SG 81 mit Antiseptika bzw. Plasma anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD _{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	5	-	-	-	29,5	1,17
CHX 0,0001 %	10	-	21 27,2	0,93 1,11	27,5	1,12
CHX 0,0000625 %	10	-	21,3 28,5	0,94 1,15	28,1	1,15
OCT 0,0002 %	11	-	25 27	0,97 1,05	26,5	1,08
OCT 0,00005 %	8,5	-	20 28	0,97 1,16	26,5	1,15
PHMB 0,0001 %	8,5	-	20,2 27	0,92 1,1	25,1	1,13
PHMB 0,000025 %	8,5	-	20,2 27	0,92 1,07	26,5	1,09
HDBD-Ar-P	13	-	-	-	32	0,94
HDBD-Ar-G	10	-	24 27	0,97 1,04	32	1,07
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	15	-	-	-	32	0,47

Fortsetzung Tab. 11: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *P. aeruginosa* SG 81 mit Antiseptika bzw. Plasma anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD _{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	5	-	-	-	29,5	1,17
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	9	-	22,3 27	0,94 1,04	32	1,07
kINPen09 [®] -Ar-P	15	-	-	-	32	0,43
kINPen09 [®] -Ar-G	14	-	-	-	32	1,1
kINPen09 [®] -Ar+ 1 % O ₂ -P	14	-	-	-	32	0,84
kINPen09 [®] -Ar+ 1 % O ₂ -G	13	-	-	-	32	0,96

2.2.2.5 *S. epidermidis* ATCC 12228

Bei diesem Erreger weisen alle antiseptischen Behandlungen einen signifikanten Einfluss auf die Reduktion des AUC-Wertes auf (Tab. 12). Es hat keine Plasmabehandlung bei diesem Erreger stattgefunden.

Tab. 12: Einfluss von CHX, PHMB und OCT bei Einwirkung bis 32 h auf die Kultur von *S. epidermidis* ATCC 12228 anhand der AUC-Werte der ermittelten Vermehrungskurven bis 32 h (\bar{x} : Mittelwert, SD: Standardabweichung, p-Wert)

Behandlung	AUC ($\bar{x} \pm SD$)	p
Kontrolle (unbehandelt)	12,05\pm0,73	
OCT 0,0002 %	1,23 \pm 0,06	0,001*
CHX 0,0001 %	3,01 \pm 1,84	0,001*
PHMB 0,0001 %	5,48 \pm 0,63	0,001*
OCT 0,00005 %	5,49 \pm 0,53	0,001*
CHX 0,00000625 %	9,29 \pm 0,52	0,001*
PHMB 0,000025 %	9,69 \pm 0,48	0,001*

*signifikant (p<0,05) zur unbehandelten Kontrolle

Einfluss der Antiseptika im zeitlichen Verlauf: Die Behandlung mit CHX 0,0001 % verzögert den Beginn der exponentiellen Phase um 13 h im Vergleich zur Kontrolle. Die OD_{max} wird nach 29 h Inkubationszeit mit 0,4 erreicht. Die OD-Werte sind stets geringer als die der Kontrolle. Gleiches gilt für die niedrigere Konzentration mit Ausnahme des Zeitraums von 26 h bis ca. 29 h, bei dem sie etwa gleich sind. Die Vermehrungsverzögerung durch CHX 0,00000625 % beträgt 3 h, wobei die OD_{max} zum Zeitpunkt 29,5 h bei 0,65 liegt (Abb. 16).

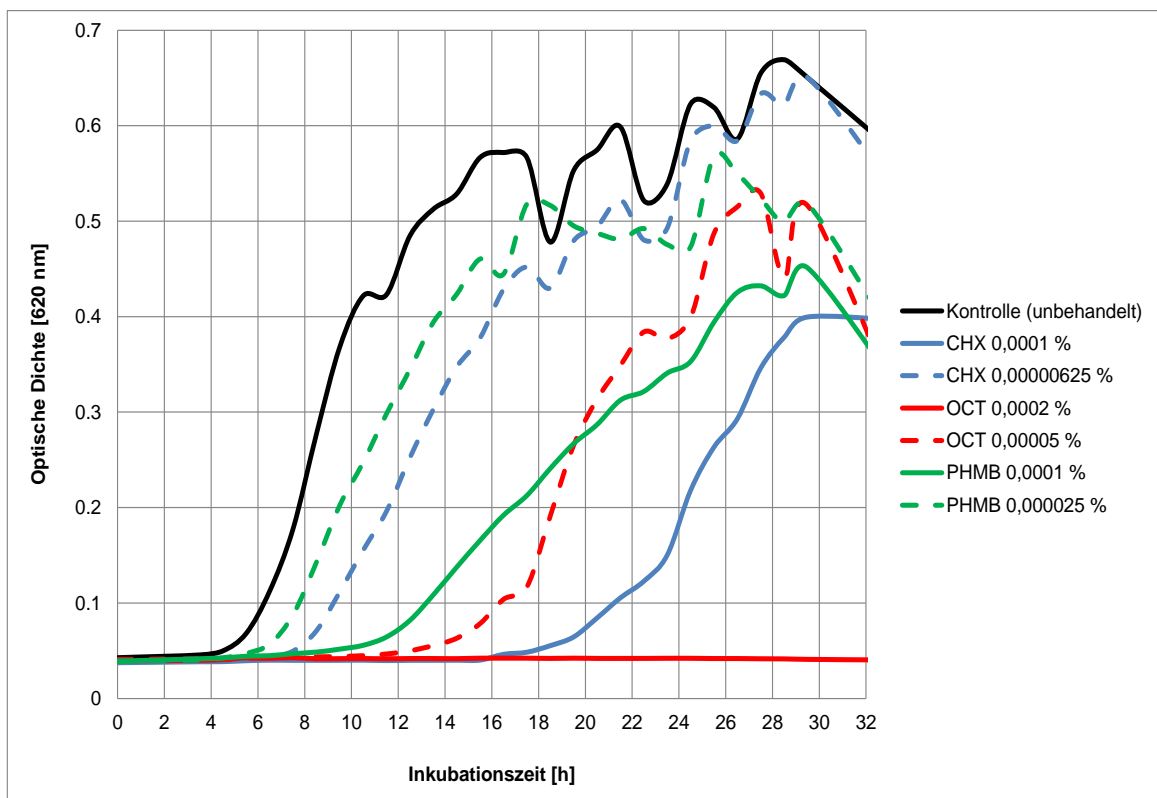


Abb. 16: Vermehrungskurven anhand der OD von *S. epidermidis* ATCC 12228 bei Einwirkung der Antiseptika CHX, PHMB und OCT über 32 h in jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen sowie der unbehandelten Kontrolle

Eine vollständige Vermehrungshemmung wird mit OCT 0,0002 % bei einer gleichbleibenden OD von 0,06 erreicht. Die geringere Konzentration erreicht ein um 8 h verzögerte Vermehrung und eine OD_{max} von 0,53 nach 27 h Inkubation. Beide Konzentrationen weisen OD-Werte auf, die stets geringer sind als die der Kontrolle.

Bei der Behandlung mit PHMB 0,0001 % ergibt sich ein um 5 h verzögerter Beginn der exponentiellen Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die OD_{max} beträgt zum Zeitpunkt 29,5 h 0,46. Die OD-Werte sind über den gesamten Zeitraum kleiner als

die der Kontrolle. Gleiches gilt, mit Ausnahme des Zeitraums von 18 h bis 19 h, für die niedrigere Konzentration. Hier beträgt die OD_{max} nach 26 h Inkubationszeit 0,57 (Abb. 16).

Überblick zu den Verlaufsdaten: In Tabelle 13 werden die zur Analyse verwendeten Werte und Charakteristika der Vermehrungskurven der verschiedenen Antiseptikabehandlungen von *S. epidermidis* ATCC 12228 gegenübergestellt. Während OCT 0,0002 % zu einer vollständigen Vermehrungshemmung führt, ist der Beginn der exponentiellen Phase bei CHX 0,00000625 % um 3 h zur Kontrolle verzögert bei einer maximalen OD von 0,65, die nahe an die der Kontrolle mit 0,67 heranreicht.

Tab. 13: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *S. epidermidis* ATCC 12228 mit Antiseptika anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD_{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	4	-	-	-	28	0,67
CHX 0,0001 %	17	-	-	-	29	0,4
CHX 0,00000625 %	7	-	26 29,2	0,59 0,65	29,5	0,65
OCT 0,0002 %		+	-	-	-	0,06
OCT 0,00005 %	12	-	-	-	27	0,53
PHMB 0,0001 %	9	-	-	-	29,5	0,46
PHMB 0,000025 %	4,5	-	18 19	0,57 0,5	26	0,57

2.2.2.6 *S. epidermidis* RP 62A

Bis auf die Anwendung des kINPen09[®]-Ar-G, von HDBD- Ar-P und HDBD-Ar+1 % O₂-G weisen alle Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle (11,39) einen signifikanten Einfluss auf die Reduktion der AUC-Werte auf (Tab. 14). Beim kINPen09[®]-Ar-G konnte aufgrund einer einmaligen Messung keine Standardabweichung berechnet werden.

Tab. 14: Einfluss von CHX, PHMB und OCT bei Einwirkung bis 32 h bzw. von 1 min Exposition mit Argonplasma (Ar-P) und Argongas (Gaskontrolle, Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1% Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD auf die Kultur von *S. epidermidis* RP 62A anhand der AUC-Werte der ermittelten Vermehrungskurven bis 32 h (\bar{x} : Mittelwert, SD: Standardabweichung, p-Wert)

Behandlung	AUC ($\bar{x} \pm SD$)	p
Kontrolle (unbehandelt)	11,39 ± 0,57	
PHMB 0,0001 %	1,22 ± 0,04	0,001*
OCT 0,0002 %	1,24 ± 0,03	0,001*
CHX 0,0001 %	2,46 ± 1,37	0,001*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -P	6,17 ± 0,30	0,002*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -G	6,35 ± 0,25	0,002*
kINPen09 [®] -Ar-G	2,50 ± -	0,121
kINPen09 [®] -Ar-P	4,65 ± 1,70	0,001*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -P	6,17 ± 0,30	0,002*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -G	6,35 ± 0,25	0,002*
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	7,31 ± 0,99	0,002*
HDBD-Ar-G	7,38 ± 2,28	0,020*
CHX 0,00000625 %	7,34 ± 0,40	0,001*
PHMB 0,000025 %	7,44 ± 0,43	0,001*
OCT 0,00005 %	8,29 ± 0,96	0,001*
HDBD-Ar-P	11,16 ± 0,41	0,606
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	12,65 ± 2,57	1,000

*signifikant (p<0,05) zur unbehandelten Kontrolle

Einfluss der Antiseptika im zeitlichen Verlauf: Bei der Behandlung mit CHX 0,0001 % verzögert sich die exponentielle Vermehrungsphase im Vergleich zur Kontrolle um 12 h (Abb. 17). Die Vermehrungsphase der niedrigeren Konzentration von CHX beginnt 3 h später als die der Kontrolle. Die OD_{max} wird für CHX 0,0001 % nach 32 h Inkubationszeit bei 0,27 und für CHX 0,00000625 % nach 30 h Inkubationszeit bei 0,63 erreicht. Beide Behandlungen weisen über den gesamten Inkubationszeitraum niedrigere OD-Werte als die Kontrolle auf.

Eine vollständige Vermehrungshemmung mit einer konstanten OD von 0,06 wird bei der Anwendung mit OCT 0,0002 % und mit PHMB 0,0001 % erreicht (Abb. 17).

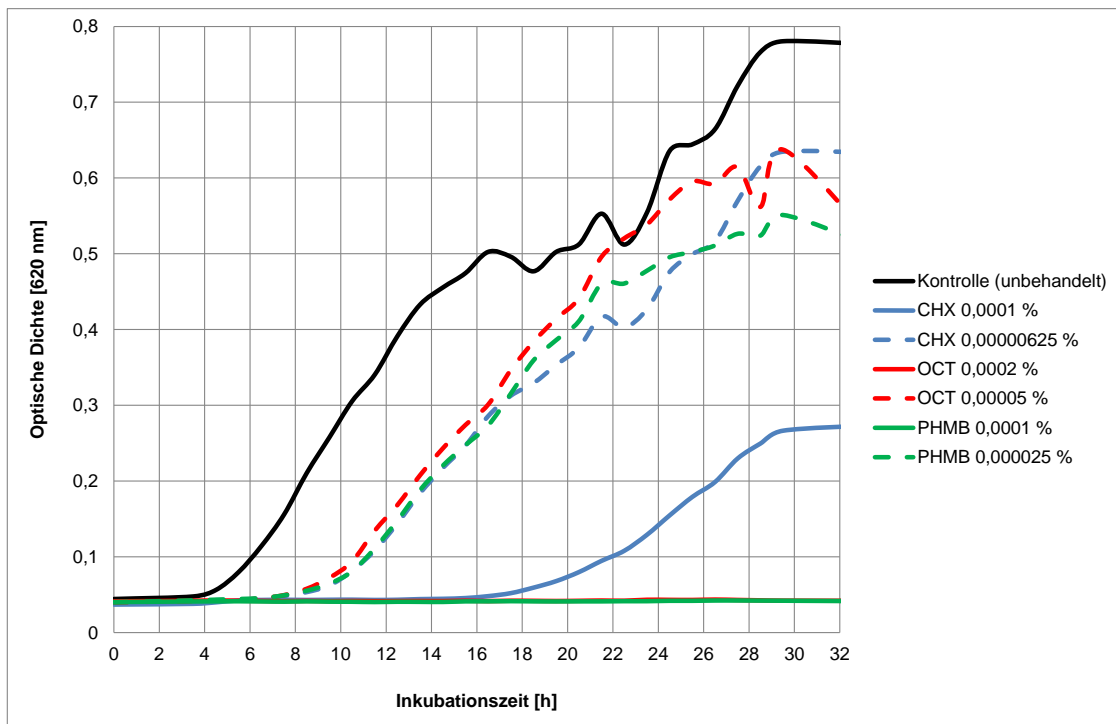


Abb. 17: Vermehrungskurven anhand der OD von *S. epidermidis* RP 62A bei Einwirkung der Antiseptika CHX, PHMB und OCT über 32 h in jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen sowie der unbehandelten Kontrolle

Wird zur antiseptischen Behandlung OCT 0,00005 % und PHMB 0,000025 % verwendet, verzögert sich der Beginn der Vermehrungsphase bei beiden um 3 h im Vergleich zur Kontrolle. OCT 0,00005 % und PHMB 0,000025 % erreichen ihren maximalen OD-Wert nach 29,5 h Inkubation bei 0,63 bzw. 0,56. Bei der Behandlung mit PHMB 0,000025 % liegen die OD-Werte über den gesamten Zeitraum unter denen der Kontrolle. Ebenso liegt die Vermehrungskurve von OCT 0,00005 % mit Ausnahme des Zeitraums zwischen 22,5 h bis 23 h unter der der Kontrolle.

Einfluss von Plasma im zeitlichen Verlauf: Bei der HDBD mit Ar-P wird der Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase um 4,5 h im Vergleich zur Kontrolle verzögert. Die beiden Gaskontrollen der HDBD verzögern den Beginn der exponentiellen Phase um weitere 2,5 h (Abb. 18). Nach 21,5 h Inkubation sind die OD-Werte beim HDBD mit Ar-P höher als die der Kontrolle. Gleiches gilt für die Gaskontrolle (HDBD-Ar-G) nach 30,5 h Inkubation.

Durch 1 % Sauerstoffzumischung beginnt bei der HDBD mit Ar-P die exponentielle Phase 11,5 h später als bei der Kontrolle. Bis zur Inkubationszeit von 32 h sind die OD-Werte niedriger als die der Kontrolle. Bei der Gaskontrolle liegen die Werte im Zeitintervall von 18,5 h bis 27 h und erneut ab 28 h über den OD-Werten der Kontrolle.

Alle Behandlungen mit der HDBD erreichen die OD_{max} im Wertebereich von 0,78 bis 1,06 nach 32 h Inkubationszeit (Tab. 15).

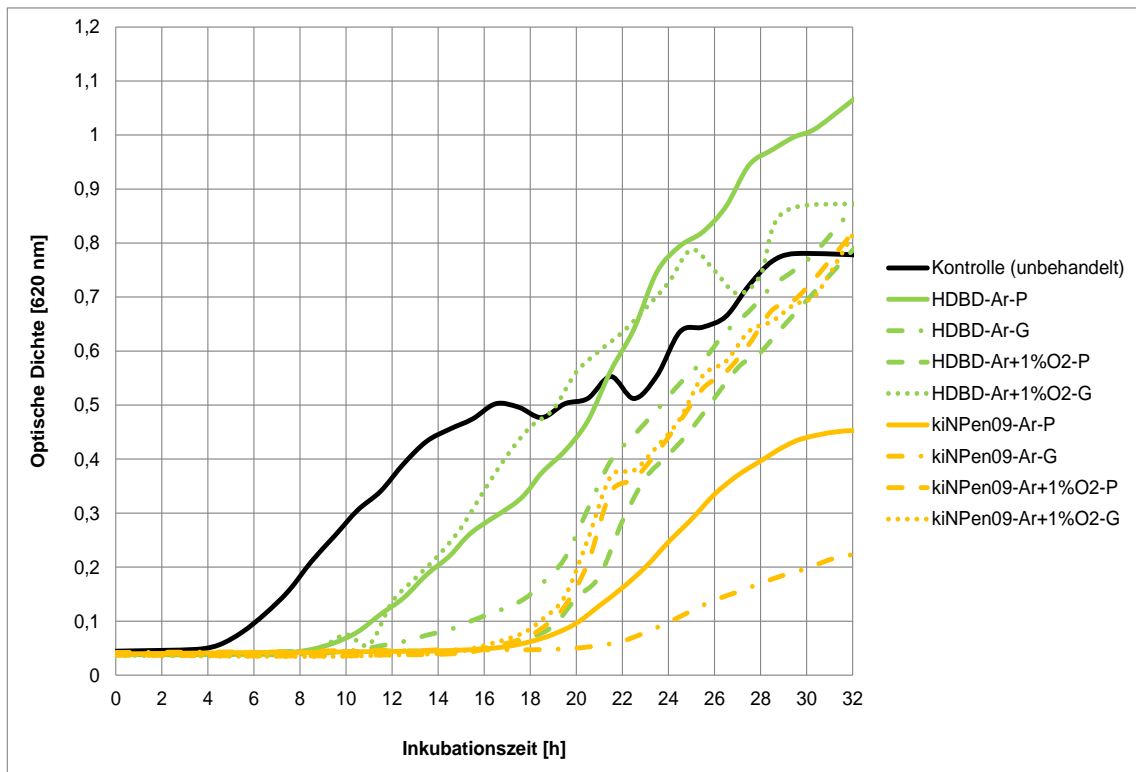


Abb. 18: Vermehrungskurven anhand der OD von *S. epidermidis* RP 62A nach Einwirkung von 1 min Argonplasma (Ar-P) bzw. Argongas (Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kiNPen09[®] und HDBD sowie der unbehandelten Kontrolle

Bei der Behandlung mit dem kiNPen09[®]-Ar-P wurde der Beginn der Vermehrungsphase um 14,5 h im Vergleich zur Kontrolle verzögert. Bei der Gaskontrolle beginnt die exponentielle Phase weitere 3,5 h später.

Bei 1 % Sauerstoffzumischung (kiNPen09[®]-Ar+1 % O₂-P) reduziert sich die Verzögerung um 0,5 h im Vergleich zum kiNPen09[®] mit Ar-P um 13 h im Vergleich zur Kontrolle. Die Gaskontrolle weist eine Vermehrungsverzögerung von 11,5 h im Vergleich zur Kontrolle auf (Abb. 18).

Überblick zu den Verlaufsdaten: In Tabelle 15 werden die zur Analyse verwendeten Werte und Charakteristika der Vermehrungskurven der verschiedenen Antiseptika und Plasmabehandlungen von *S. epidermidis* RP 62A gegenübergestellt. Hieraus ist ersichtlich, dass neben der vollständigen Vermehrungshemmung durch OCT 0,0002 % und PHMB 0,0001 % die Behandlung mit dem kiNPen09[®]-Ar-G und mit CHX 0,0001 %

die kleinsten maximalen OD-Werte von 0,23 bzw. 0,27 aufweisen. Die Behandlung mit HDBD-Ar-P ergibt hier den höchsten maximalen OD-Wert von 1,06 (Tab. 15)

Tab. 15: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *S. epidermidis* RP 62A mit Antiseptika bzw. Plasma anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD _{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	3,5	-	-	-	30	0,77
CHX 0,0001 %	15,5	-	-	-	32	0,27
CHX 0,00000625 %	6,5	-	-	-	30	0,63
OCT 0,0002 %		+	-	-	-	0,06
OCT 0,00005 %	6,5	-	22,5 23	0,52 0,53	29,5	0,63
PHMB 0,0001 %		+	-	-	-	-
PHMB 0,000025 %	6,5	-	-	-	29,5	0,56
HDBD-Ar-P	8	-	21,5	0,55	32	1,06
HDBD-Ar-G	10,5	-	30,5	0,78	32	0,87
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	15	-	32	0,77	32	0,78
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	10,5	-	18,5 27 28	0,47 0,7 0,75	32	0,87
kINPen09 [®] -Ar-P	17	-	-	-	32	0,45
kINPen09 [®] -Ar-G	20,5	-	-	-	32	0,23
kINPen09 [®] -Ar+ 1 % O ₂ -P	16,5	-	31,5	0,77	32	0,83
kINPen09 [®] -Ar+ 1 % O ₂ -G	15	-	31,5	0,77	32	0,83

2.2.2.7 *S. mutans* DSM 20523

Mit Ausnahme der Behandlung mit CHX 0,00000625 % und dem kINPen09[®]-Ar-G, bei dem aufgrund der einmaligen Messung keine Standardabweichung berechnet werden konnte, sind die AUC-Werte signifikant verschieden gegenüber der Kontrolle (Tab. 16).

Tab. 16: Einfluss von CHX, PHMB und OCT bei Einwirkung bis 32 h bzw. von 1 min Exposition von Argonplasma (Ar-P) und Argongas (Gaskontrolle, Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD auf die Kultur von *S. mutans* DSM 20523 anhand der AUC-Werte der ermittelten Vermehrungskurven bis 32 h (\bar{x} : Mittelwert, SD: Standardabweichung, p-Wert)

Behandlung	AUC ($\bar{x} \pm SD$)	p
Kontrolle (unbehandelt)	10,15 ± 0,67	
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -P	3,81 ± 0,43	0,002*
PHMB 0,000025 %	5,05 ± 0,66	0,001*
kINPen09 [®] -Ar-P	5,41 ± 1,58	0,001*
OCT 0,0002 %	5,55 ± 1,02	0,001*
PHMB 0,0001 %	5,62 ± 0,65	0,001*
kINPen09 [®] -Ar-G	6,64 ± -	0,121
OCT 0,00005 %	7,21 ± 0,55	0,001*
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -G	8,71 ± 0,81	0,005*
CHX 0,00000625 %	9,21 ± 1,06	0,059
CHX 0,0001 %	9,28 ± 0,60	0,021*
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	12,03 ± 1,16	0,007*
HDBD-Ar-P	12,06 ± 0,60	0,003*
HDBD-Ar-G	12,75 ± 1,41	0,005*
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	14,42 ± 1,03	0,002*

*signifikant (p<0,05) zur unbehandelten Kontrolle

Einfluss der Antiseptika im zeitlichen Verlauf: Die Vermehrungskurven der Behandlungen mit CHX 0,0001 % und CHX 0,00000625 % liegen mit dem Beginn der Zeitaufzeichnung mit einer Anfangs-OD von 0,12 bzw. 0,11 über dem Startwert der unbehandelten Kontrolle. Der Beginn der exponentiellen Phase setzt nach 3 h und damit 0,5 h früher als bei der Kontrolle ein. Die OD-Werte von CHX 0,0001 % liegen im Zeitintervall von 11 h bis 32 h unter denen der Kontrolle. Entsprechendes gilt auch für die niedrigere Konzentration mit der Einschränkung, dass die OD-Werte ab 31,5 h über denen der Kontrolle liegen (Abb. 19). CHX 0,0001 % und CHX 0,00000625 % erreichen ihre maximalen OD-Werte nach einer Inkubationszeit von 32 h bei 0,47 bzw. 0,49.

Bei der Verwendung von OCT 0,0002 % verzögert sich der Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase um 13,5 h im Vergleich zur Kontrolle. Die OD-Werte sind über den gesamten Inkubationszeitraum kleiner als die der Kontrolle. Die OD_{max} wird nach 22 h mit 0,32 erreicht. Bei der geringeren Konzentration von OCT mit 0,00005 % beginnt die

Vermehrungsphase 11,5 h später als bei der Kontrolle. Mit Ausnahme vom Zeitpunkt bei 21 h sind die OD-Werte kleiner als die der Kontrolle. Zusätzlich beträgt zu diesem Zeitpunkt die maximale OD 0,44 (Abb. 19).

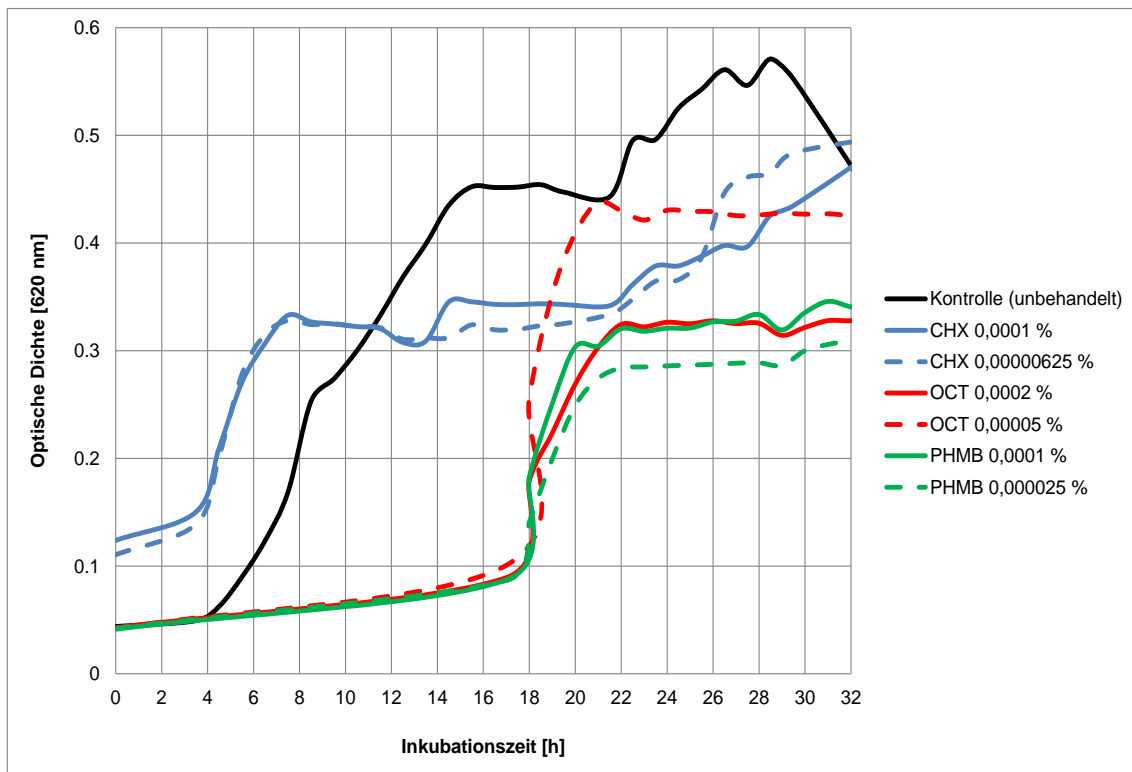


Abb. 19: Vermehrungskurven anhand der OD von *S. mutans* DSM 20523 bei Einwirkung der Antiseptika CHX, PHMB und OCT über 32 h in jeweils 2 unterschiedlichen Konzentrationen sowie der unbehandelten Kontrolle

Bei Einsatz von PHMB wird durch beide Konzentrationen der Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase um 13,5 h verzögert. Die Behandlungen mit PHMB 0,0001 % und PHMB 0,000025 % weisen zu jedem Zeitpunkt kleinere OD-Werte als die Kontrolle auf und erreichen nach 31 h bei 0,34 bzw. 32 h bei 0,31 ihren maximalen OD-Wert (Abb. 19).

Einfluss von Plasma im zeitlichen Verlauf: Die OD-Werte der Anfänge der Vermehrungskurven der HDBD-Behandlungen liegen zwischen 0,22 und 0,28, die der kINPen09[®]-Behandlungen zwischen 0,7 und 1,2 und damit über der Kontrolle. Bei der HDBD-Behandlung mit Ar-P und der Gaskontrolle wird der Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase um 3 h im Vergleich zur Kontrolle verzögert (Abb. 20). Bei der Verwendung von Ar-P werden nach der Inkubationszeit von 15 h kleinere OD-Werte als bei der Kontrolle erreicht. Die Gaskontrolle erreicht ab diesem Zeitpunkt häufiger die Werte der Kontrolle (Tab. 17) und weist im Inkubationszeitraum zwischen 21,5 h

und 28 h geringere OD-Werte als die Kontrolle auf. Die maximalen OD-Werte werden bei HDBD-Ar-P-Behandlung nach 26,5 h mit 0,48 und bei der entsprechenden Gaskontrolle nach 28,5 h mit einem OD-Wert von 0,58 erreicht.

Bei der Behandlung mit HDBD-Ar+1 % O₂-P beginnt die Vermehrungsphase 2 h später als bei der Kontrolle. Die Behandlung erreicht nach 14 h und ca. 20 h OD-Werte der Kontrolle und weist in dieser Zeitspanne und zusätzlich ab 23,5 h Inkubationszeit geringere OD-Werte im Vergleich zur Kontrolle auf. Bei der Gaskontrolle (HDBD-Ar+1 % O₂-G) beginnt die exponentielle Phase 1 h später als bei der Kontrolle. In der Zeitspanne zwischen 22 h bis 28 h und nach 28,5 h werden geringere OD-Werte als bei der Kontrolle erreicht. Bei 28 h Inkubation hat die Gaskontrolle ihren maximalen OD-Wert von 0,56 (Abb. 20).

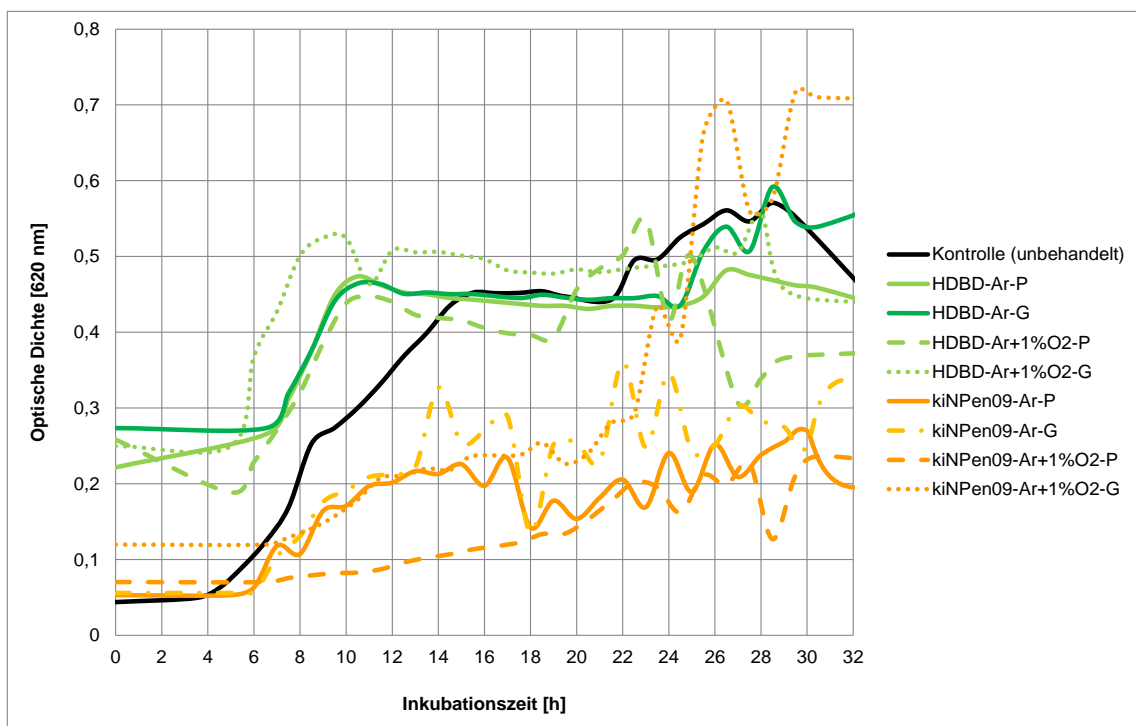


Abb. 20: Vermehrungskurven anhand der OD von *S. mutans* DSM 20523 nach Einwirkung von 1 min Argonplasma (Ar-P) bzw. Argongas (Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kiNPen09[®] und HDBD sowie der unbehandelten Kontrolle

Bei dem kiNPen09[®] mit Ar-P ist der Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase um 2 h verzögert. Nach 4 h Inkubationszeit sind die OD-Werte kleiner als die der Kontrolle. Entsprechendes gilt für die Gaskontrolle. Der Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase liegt hier 2,5 h später im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung

mit dem kINPen09[®]-Ar-P erreicht ihre OD_{max} nach 29,5 h mit 0,27, die der Gaskontrolle nach 22 h mit 0,36 (Tab.17).

Bei 1% Sauerstoffzumischung zum Plasma ergibt sich eine Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase von 3 h im Vergleich zur Kontrolle. Nach 4,5 h Inkubationszeit sind die Werte beim kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-P stets kleiner als die der Kontrolle. Die OD_{max} beträgt nach 30,5 h Inkubation 0,24. Die Gaskontrolle hat im Inkubationszeitraum von 6,5 h bis 25 h geringere OD-Werte im Vergleich zur Kontrolle und erreicht ihren maximalen OD-Wert nach 29,5 h mit 0,73.

Überblick zu den Verlaufsdaten: In Tabelle 17 werden die zur Analyse verwendeten Werte und Charakteristika der Vermehrungskurven der verschiedenen Antiseptika und Plasmabehandlungen von *S. mutans* DSM 20523 gegenübergestellt. Aus ihr ist ersichtlich, dass die kleinsten maximalen OD-Werte vom kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-P mit 0,24 und vom kINPen09[®]-Ar-P mit 0,27 erreicht wurden. Die Behandlung mit kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-G lieferte die höchsten maximalen OD-Werte von 0,73.

Tab. 17: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *S. mutans* DSM 20523 mit Antiseptika bzw. Plasma anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD _{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	3,5	-	-	-	28,5	0,57
CHX 0,0001 %	3	-	11 32	0,32 0,42	32	0,47
CHX 0,00000625 %	3	-	11 31,5	0,32 0,49	32	0,49
OCT 0,0002 %	17	-	-	-	22	0,32
OCT 0,00005 %	14	-	21	0,49	21	0,44
PHMB 0,0001 %	17	-	-	-	31	0,34
PHMB 0,000025 %	17	-	-	-	32	0,31
HDBD-Ar-P	6,5	-	15	0,44	26,5	0,48
HDBD-Ar-G	6,5	-	15 20,5 21,5 28 29,2 30	0,45 0,44 0,44 0,55 0,56 0,54	28,5	0,58
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	5,5	-	14 19,8 23,5	0,42 0,44 0,49	23	0,55
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	4,5	-	22,2 28	0,48 0,56	28	0,56
kINPen09® - Ar-P	5,5	-	4	0,05	29	0,27
kINPen09® - Ar-G	6	-	4	0,05	22	0,36
kINPen09® - Ar+1 % O ₂ -P	6,5	-	4	0,07	30,5	0,24
kINPen09® - Ar+1 % O ₂ -G	6,5	-	6,5 25 27,8 28,5	0,12 0,58 0,55 0,57	29,5	0,73

2.2.2.8 *S. sanguinis* DSM 20068

Die Kontrollkurve wurde von den Vorversuchen übernommen, da die hierzu gehörige Kontrolle aufgrund von Messfehlern verworfen werden musste. Signifikanzberechnungen konnten daher nicht durchgeführt werden. Die Behandlung von *S. sanguinis* DSM 20068 wurde nur mit Plasma durchgeführt. Die AUC-Werte sind nach Anwendung der HDBD-Quelle ausnahmslos größer als nach Anwendung des kINPen09® (Tab. 18).

Tab. 18: Einfluss von 1 min Exposition mit Argonplasma (Ar-P) und Argongas (Gaskontrolle, Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff (+1 % O₂) der Plasmaquellen kINPen09® und HDBD auf die Kultur von *S. sanguinis* DSM 20068 anhand der AUC-Werte der ermittelten Vermehrungskurven bis 32 h (\bar{x} : Mittelwert, SD: Standardabweichung)

Behandlung	AUC ($\bar{x} \pm SD$)
Kontrolle (unbehandelt)	fehlt hier
kINPen09®-Ar+1 % O ₂ -P	5,06 ± 0,35
kINPen09®-Ar-P	5,33 ± 1,69
kINPen09®-Ar+1 % O ₂ -G	6,71 ± 0,97
kINPen09®-Ar-G	7,36 ± -
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	11,62 ± 1,44
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	15,11 ± 0,96
HDBD-Ar-P	13,13 ± 1,69
HDBD-Ar-G	11,80 ± 1,45

Einfluss von Plasma im zeitlichen Verlauf: Die HDBD-Behandlungen haben ihren Startpunkt oberhalb der Kontrolle bei einer OD von 0,27. Einzig die Behandlung mit HDBD-Ar+ 1 % O₂ beginnt bei 0,14. Die Behandlung mit der HDBD mit Ar-P und der Gaskontrolle verzögern die Vermehrung um 6 h im Vergleich zur Kontrolle aus den Vorversuchen. Bei der HDBD mit Ar-P werden über den gesamten Zeitraum höhere OD-Werte als in der Kontrolle gemessen. Die OD_{max} beträgt nach 10,5 h Inkubationszeit 0,52. Die Gaskontrolle weist außerhalb der Zeitspanne von 4,5 h bis 7,5 h größere OD-Werte im Vergleich zur Kontrolle auf und erreicht eine OD_{max} von 0,45 zum Zeitpunkt 11 h (Abb. 21).

Durch 1 % Sauerstoffbeimischung reduziert sich die Vermehrungsverzögerung um 2 h im Vergleich zur Ar-P-Behandlung. Bis zur Inkubationszeit von 10 h sind die OD-Werte

niedriger als die der Kontrolle. Nach 24 h Inkubationszeit wird eine OD_{max} von 0,6 erreicht. Bei der Gaskontrolle beginnt die exponentielle Vermehrungsphase 1,5 h später als bei der HDBD-Ar+1 % O_2 -P. Die OD_{max} beträgt 0,54 und wird nach 9,5 h Inkubationszeit erreicht (Abb. 21).

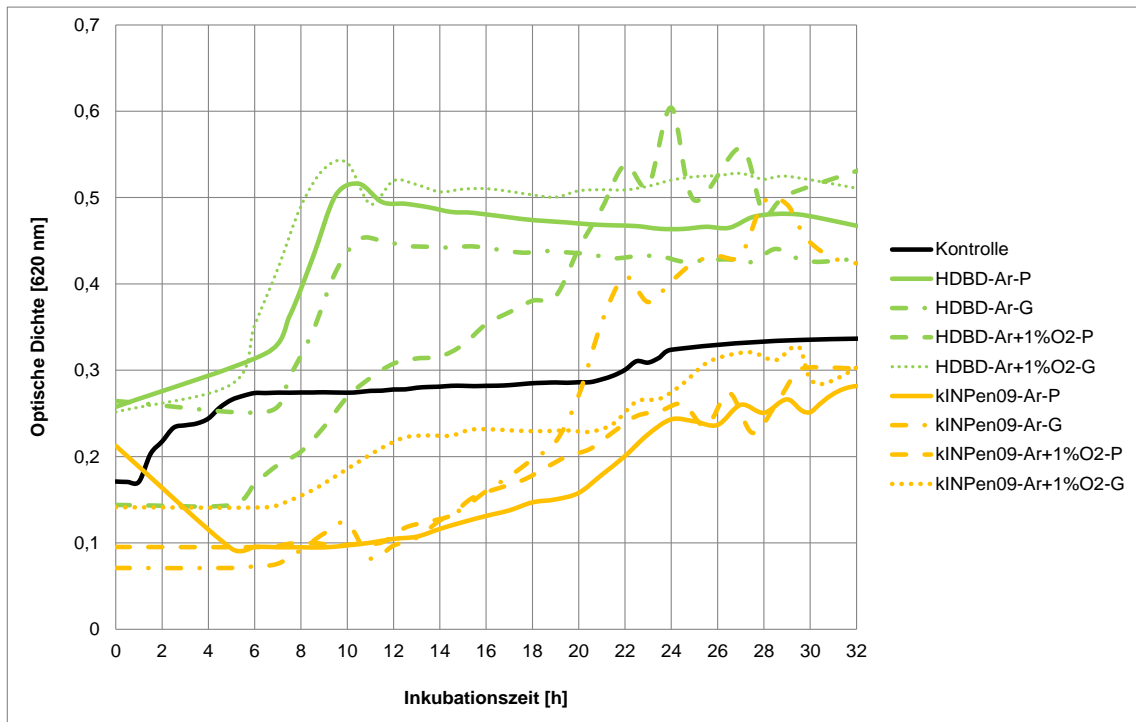


Abb. 21: Vermehrungskurven anhand der OD von *S. sanguinis* DSM 20068 nach Einwirkung von 1 min Argonplasma (Ar-P) bzw. Argongas (Ar-G) mit und ohne Beimischung von 1 % Sauerstoff (+1 % O_2) der Plasmaquellen kINPen09[®] und HDBD sowie der unbehandelten Kontrolle

Bei der Behandlung mit dem kINPen09[®] mit Ar-P, die bei einer OD von 0,21 oberhalb der Kontrolle beginnt, kommt es in den ersten 5 h zu einer Abnahme der OD auf 0,1. Der Beginn der Vermehrungsphase liegt bei 12 h, 11 h verzögert zur Kontrolle. Die Gaskontrolle hat ihren Startpunkt bei einer OD von 0,08 und verzögert den Vermehrungsbeginn um 6 h zur Kontrolle. Bei der Behandlung mit dem kINPen09[®] mit Ar-P werden nach 1,5 h Inkubationszeit stets geringere OD-Werte als bei der Kontrolle erreicht. Die OD_{max} beträgt 0,27 zum Inkubationszeitpunkt von 32 h. Die Gaskontrolle erreicht zum Zeitpunkt 28,5 h ihre OD_{max} von 0,5 (Tab.19).

Die Kurve mit Zugabe von 1 % Sauerstoff beginnt bei einer OD von 0,1 und verzögert den Beginn der exponentiellen Phase um 10 h im Vergleich zur Kontrolle. Entsprechendes gilt für die Gaskontrolle, deren Kurve bei einer OD von 0,14 beginnt. Die Behandlungen erreichen ihre OD_{max} nach 30 h mit 0,3 bzw. nach 29 h mit 0,33.

Beide Behandlungen weisen über den gesamten Inkubationszeitraum von 32 h OD-Werte auf, die kleiner sind als die der Kontrolle (Abb. 21).

Überblick zu den Verlaufsdaten: In Tabelle 19 werden die zur Analyse verwendeten Werte und Charakteristika der Vermehrungskurven der Plasmabehandlungen von *S. sanguinis* DSM 20068 gegenübergestellt. Hieraus ist ersichtlich, dass die Behandlungen mit dem kINPen[®]-Ar-P ohne und mit Sauerstoff zu den kleinsten maximalen OD-Werten mit 0,27 bzw. 0,3 führen. Der größte maximale OD-Wert beträgt bei der Behandlung mit HDBD+1 % O₂-P 0,60.

Tab. 19: Zusammenfassender Vergleich der Behandlungen von *S. sanguinis* DSM 20068 mit Plasma anhand folgender Merkmale: Beginn der exponentiellen Phase (exp. Phase), vollständige Proliferationshemmung, Schnittpunkte (S) der Kurvenverläufe mit der Kontrolle und maximale erreichte OD (OD_{max}) mit der jeweils zugehörigen Inkubationszeit

Behandlung	Beginn der exp. Phase (h)	Vollständige Proliferationshemmung (+)	S mit der Kontrolle		OD _{max}	
			Zeit [h]	OD	Zeit [h]	OD
Kontrolle	1	-	-	-	29	0,34
HDBD-Ar-P	7	-	-	-	10,5	0,52
HDBD-Ar-G	7	-	4,5 7,5	0,25 0,27	11	0,45
HDBD-Ar+1 % O ₂ -P	5	-	10	0,25	24	0,60
HDBD-Ar+1 % O ₂ -G	6,5	-	-	-	9,5	0,54
kINPen09 [®] -Ar-P	12	-	1,5	0,17	32	0,27
kINPen09 [®] -Ar-G	7	-	20,2	0,28	28,5	0,50
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -P	11	-	-	-	30	0,3
kINPen09 [®] -Ar+1 % O ₂ -G	7	-	-	-	29,5	0,33

3 Diskussion

Biofilmbildende Mikroorganismen haben für die Klinik eine große Bedeutung. Biofilme bilden sich beispielsweise an Implantaten, wie Katheter, Endoprothesen oder an Kontaktlinsen und werden für 65 % der nosokomialen Infektionen verantwortlich gemacht (Ma u. O`Tool 2001). Durch die extrazelluläre Biofilmmatrix sind die Zellen vor unterschiedlichsten chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen geschützt, was zu einer stärkeren Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen führt (Koban et al. 2010b). Durch Zerstörung der Biofilme oder Hemmung ihrer Entstehung können Infektionsrisiken reduziert und der Heilungsprozess unterstützt werden. Bisherige Studien konnten zeigen, dass TTP Biofilme eradizieren bzw. reduzieren oder deren Entstehung hemmen kann (Kramer et al. 2010b; Koban et al. 2010b, 2011, 2012; Fricke et al. 2012; Gorynia et al. 2013; Matthes et al. 2013a, b)

In dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Wirksamkeit auf die Vermehrung ausgewählter biofilmbildender und nicht biofilmbildender Mikroorganismen bei 60 s Einwirkung von Plasma mittels kINPen09[®] und HDBD getestet und mit der Wirksamkeit der Antiseptika OCT, CHX und PHMB verglichen, die während der gesamten Untersuchungsphase in den Wells auf die Vermehrung der Prüforganismen einwirkten. Der kINPen09[®] wurde für die Generierung des Atmosphärendruckplasmas verwendet, da dieser gewebeverträglich ist und ein großes Potential für die Wundbehandlung hat (Fricke et al. 2012; Lademann et al. 2012a; Kramer et al. 2013a; Matthes et al. 2013b), ohne die Haut erkennbar zu schädigen (Lademann et al. 2010, 2012b, 2013). Die Hauptwirkungskomponente von TTP wird der Generierung von freien Radikalen zugeschrieben (Fluhr et al. 2011). Atmosphärendruckplasma ist zur Oberflächendekontamination bei einer Vielzahl von Bakterien und Pilzen als hocheffektiv getestet worden (Scholtz et al. 2007).

Die Effektivität der verschiedenen antiseptischen Behandlungen wird in dieser Arbeit durch die AUC objektiviert und mit der Kontrolle verglichen. Generell lässt sich konstatieren, dass je kleiner die Fläche unter der Kurve ist, desto später setzt die exponentielle Phase ein, und je geringer die maximale optische Dichte ist, umso besser wirkt die Behandlung.

3.1 Methodische Gesichtspunkte der Vorversuche

In den innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Vorversuchen mussten die Fragen beantwortet werden, ob die Vermehrungskurven zuverlässig mittels der optischen Dichte bestimmt werden können, bei welcher Wellenlänge des Spectrophotometers die optische Dichte und die KbE/ml miteinander korrelieren und, ob unterschiedliche Verdünnungen abweichende Eigenschaften in der Kinetik der Vermehrung zeigen und welche Verdünnungsstufe sich am günstigsten für die Durchführung der Hauptversuche eignet.

Aus den Ergebnissen der Vorversuche lässt sich für alle betrachteten Stämme eine Korrelation der Vermehrungskurven zwischen OD und KbE/ml erkennen. Es war demnach für die Hauptversuche möglich, aus der zeitlich gestaffelten Bestimmung der OD-Werte die Vermehrungskurven für die einzelnen Prüforganismen zu generieren.

Durch den langen Untersuchungszeitraum der einzelnen Behandlungen von 32 h war es möglich, eine tatsächliche dauerhafte Abtötung einzelner Mikroorganismen nachzuweisen. Eine kürzere Betrachtungszeitspanne hätte zu falschen Einschätzungen der Wirksamkeit von Plasma und Antiseptika führen können.

Aufgrund des Ergebnisses, dass die OD-Werte mit den KbE/ml-Werten unabhängig von den vorgewählten Wellenlängen von 540, 600 und 660 nm zur Absorptionsdetektion korrelieren, regelmäßig steigende OD-Werte proportional steigende KbE/ml-Werte ergeben, wurde entschieden, für die Hauptversuche mit dem Biochrom Anthos 2020 Microplate Reader die zur Verfügung stehende Wellenlänge von 620 nm zu verwenden. Auch wenn diese Wellenlänge nicht untersucht wurde, konnte aufgrund der Spanne der vorgewählten Wellenlängen davon ausgegangen werden, dass sich das Ergebnis nicht unterscheiden würde.

Für die Ermittlung der günstigsten bakteriellen Verdünnungsstufe im Hinblick auf die Hauptversuche wurden für die Detektion der optischen Dichte, wie für die Hauptversuche, die Wellenlänge von 620 nm verwendet. Ausgehend von der Startkonzentration mit 10^6 KbE/ml wurden durch dekadische Verdünnungen die Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} erreicht. Alle Stämme lieferten hier vergleichbare Ergebnisse.

Jede dekadische Steigerung der Verdünnungsstufen führte zu einer Verzögerung des Beginns der exponentiellen Vermehrung von 2 h. Die Verläufe der exponentiellen Vermehrungsphasen der Kurven waren anschließend parallel, wobei sich die OD-Werte in der Plateau-Phase um ca. 0,1 unterschieden. Für die Hauptversuche wurde aufgrund des zeitlich günstigen Beginns der exponentiellen Phase und den gleichen Vermehrungseigenschaften bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen entschieden, die Verdünnungsstufe 10^{-1} zu verwenden, was der Startkonzentration von 10^5 KbE/ml entspricht.

3.2 Ergebnisse der Hauptversuche

Die Hauptversuche mit den Antiseptika- und Plasmabehandlungen der ausgewählten Mikroorganismen wurden auf der Grundlage der Erkenntnisse aus den Vorversuchen durchgeführt.

3.2.1 *C. albicans* ATCC 10231 und SC 5314

Für *C. albicans* ATCC 10231 zeigte die Behandlung mit OCT 0,0002 % und HDBD-Ar+1 % O₂-P den stärksten Effekt im Sinne einer vollständigen Vermehrungshemmung. Daneben waren die Plasmabehandlungen mittels HDBD-Ar-P und dem kINPen09®-Ar-P ohne die Zumischung von Sauerstoff mit einer maximalen OD von 0,11 bzw. 0,12 mit einem stark verzögerten und sehr flachen Kurvenanstieg nur geringfügig weniger wirkungsvoll (Tab. 4). Die zugehörigen Gaskontrollen zeigten ebenfalls einen vermehrungshemmenden Effekt, doch war dieser weniger stark als bei den entsprechenden Plasmabehandlungen. Am ungünstigsten schnitten die Behandlungen mit PHMB und CHX ab, die zwar zu einer Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase um 2 h führten, dann aber teilweise über den OD-Werten der Kontrolle lagen und im Fall von PHMB den OD_{max} der Kontrolle noch überschritten. Die geringere Konzentration von OCT war für die Reduktion der Vermehrung deutlich weniger effektiv als die höhere Konzentration.

Bei CHX und PHMB waren die Unterschiede zwischen den Prüfkonzentrationen nur marginal. Dass eine 60 s Behandlung mit CHX durchaus wirksam gegen Biofilme von *C. albicans* ATCC 10231 sein kann, zeigt eine Studie von Bürgers et al. (2012). Allerdings wurde hierbei eine 2000fach höhere Konzentration (CHX 0,2 %) verwandt, was den stärkeren Effekt erklären dürfte.

Im Vergleich zu einer Studie, die sich mit der Entfernung von 10-20 µm dicken *Candida*-Biofilmen mittels Plasma befasste (Fricke et al. 2012), zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die Behandlung wurde mit dem Hochfrequenz-Atmosphärendruck-Plasmajet kINPen08 durchgeführt, der zwischen 60 und 300 s auf Biofilm-bedeckte Mikroplättchen aus Polystyren gerichtet wurde. Bei Zugabe von 1 % Sauerstoff zum Argongas konnte nach 300 s Plasma-Behandlung eine komplette Entfernung der Biofilme demonstriert werden. Argonplasma allein war hierbei kaum wirksam. Auch in der vorliegenden Arbeit erwies sich die Zugabe von 1 % Sauerstoff zum Argongas als effektiver in der Reduzierung der Vermehrung als die einfache Plasmabehandlung. Anders als in der Arbeit von Fricke et al. galt dies aber nur für die HDBD-Behandlung. Bei der Behandlung mit dem kINPen09[®] war die Behandlung ohne Zugabe von Sauerstoff jener mit Zugabe überlegen. Zu beachten sind hierbei aber die Unterschiede in der Effektivitätsbeurteilung. Während in der vorliegenden Arbeit die Unterschiede der AUC als Indikator für die Effektivität galten, haben Fricke et al. die flächenmäßige Verringerung des Biofilms verwendet.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die Behandlung von *C. albicans* SC 5314. Auch hier führte die Behandlung mit OCT 0,0002 % und HDBD-Ar+1 % O₂-P zu einer vollständigen Vermehrungshemmung. Die CHX- und PHMB- Konzentrationen sowie die 0,00005 %ige OCT-Lösung verzögern den Beginn der exponentiellen Phase lediglich um 2,5 h und verlaufen dann untereinander nahezu parallel und parallel zur Kontrollkurve, deren OD-Wert sie alle zwischen 16,5 und 24 h überschreiten. Die parallelen Verläufe, die sich von den Ergebnissen für *C. albicans* ATCC 10231 unterscheiden und damit insgesamt weniger effektive Behandlungen darstellen, könnten mit einer unterschiedlich starken Empfindlichkeit gegenüber Antiseptika, einer differenten Kolonimorphologie und abweichender ökologischer Verbreitung mit Bildung von Resistenzmechanismen, die über die unterschiedlich starke Biofilmbildung hinausgeht, erklärt werden (Xiaogang et al. 2003). Der SC 5314-Stamm stellt sich hier resistenter gegen die Antiseptika mit Ausnahme von OCT 0,0002 % dar.

Demgegenüber korrelierten die Ergebnisse der Plasmabehandlungen der beiden *Candida*-Spezies besser miteinander. Die Vermehrungskurven verliefen mit zwei Ausnahmen nahezu identisch. Auch hier ergaben die HDBD- Behandlungen mit Argongas + 1 % O₂ die ungünstigsten Ergebnisse mit einer Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase von lediglich 3,5 h im Gegensatz zur Kontrolle. Trotzdem war diese Behandlung mit Ausnahme von OCT 0,0002 % effektiver als alle anderen getesteten Antiseptikabehandlungen. Die Argongas-Behandlung mit dem kINPen09[®] war mit einer Verzögerung der Vermehrung von 8 h die einzige Behandlung, die die

OD-Werte der Kontrolle überschritten hat. Die beiden nach HDBD-Ar+1 % O₂-P wirksamsten Plasmabehandlungen waren hier die kINPen09[®]-Ar-P- und die kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-P-Behandlungen, wenn sie auch mit der Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase von 12,5 bzw. 6,5 h und einer maximalen OD von 0,46 bzw. 0,50 etwas weniger effektiv waren als bei dem *C. albicans* ATCC Stamm (Tab.7). Zur Erklärung könnte auch hier eine unterschiedlich starke Resistenzbildung zwischen den beiden Candida-Species herangezogen werden. Ein Aspekt, der die bessere Wirksamkeit der HDBD bei Sauerstoffzugabe erklären könnte, sind zytotoxisch wirksame oxidative Prozesse, die bei normaler Luftsauerstoffkonzentration weniger zum Tragen kommen könnten. Anders als erwartet war dieser Effekt beim kINPen09[®] nicht zu beobachten. Hier war die Behandlung ohne Sauerstoffzugabe wirkungsvoller. Insgesamt zeigt sich mit Ausnahme von OCT 0,0002 % eine breite Überlegenheit der Behandlungen mit Plasma gegenüber der Behandlungen mit Antiseptika bei beiden Stämmen von *C. albicans*.

3.2.2 *P. aeruginosa* ATCC 9027 und SG 81

Bei *P. aeruginosa* ATCC 9027 haben keine Plasmabehandlungen stattgefunden, da diese zuvor beim Stamm *P. aeruginosa* SG 81 durchgeführt worden waren. Da *P. aeruginosa* SG 81 gute biofilmbildende Eigenschaften besitzt (Matthes et al. 2013b), wofür die Plasmabehandlung prädestiniert ist, war bei dem ATCC Stamm keine geringere Effektivität nach Plasmabehandlung zu erwarten. Die Verläufe der Vermehrungskurven des ATCC-Stamms sind ähnlich denen des SG 81-Stamms. Als wirksamstes Antiseptikum hat sich auch hierbei OCT 0,0002 % mit einer Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase von 4 h im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 9) herausgestellt. Die maximale OD liegt aber mit 1,19 nur unwesentlich unter der der Kontrolle von 1,23 (Tab. 9) und auch die AUC ist mit 18,43±0,77 nur wenig geringer als die der Kontrolle mit 24,42 ± 0,28.

Das zeigt, dass sich die Kultur mit *P. aeruginosa* auch nach den antiseptischen Behandlungen komplett regenerieren kann. Bei beiden *P. aeruginosa* Stämmen zeigte die höhere Konzentration von OCT 0,0002 % einen stärkeren Effekt als die niedrigere Konzentration mit 0,00005 %. Bei CHX und PHMB ist ein Wirkungsunterschied zwischen den jeweils höheren und niedrigeren Konzentrationen nicht zu erkennen.

In einer Studie von Matthes et al. (2013b) wurde die Effektivität einer 600 s langen Einwirkung einer 0,1 %igen CHX Lösung mit einer 30, 60, 150 und 300 s langen Plasmabehandlung mit dem kINPen09[®] mit Argon und Argon/O₂-Gemisch in vitro auf die Reduktion von Biofilmen von *P. aeruginosa* SG 81 und *S. epidermidis* RP 62A verglichen. Für *P. aeruginosa* war die 30 s Plasmabehandlung mit Argon ebenso effektiv wie die 600 s Behandlung mit CHX 0,1 %. Alle längeren Behandlungszeiten waren signifikant effektiver als die Behandlung mit CHX 0,1 %. Bis auf die 300 s Behandlung wirkten die Plasmabehandlungen mit Sauerstoff effektiver als jene ohne Sauerstoff. Das Resultat, dass die Plasmabehandlung signifikant antimikrobiell wirkt und ab einer Einwirkzeit von 60 s effektiver ist als die Behandlung mit CHX, korreliert mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit erhalten wurden.

Eine andere Studie von Matthes et al. (2013a) verglich die antimikrobielle Wirksamkeit einer Luft-Plasma-Behandlung mit SBD (Surface Dielectric Barrier Discharge) für 30, 60, 150, 300 und 600 s als Faden- und Flächenelektrode mit einer Antiseptikabehandlung mit CHX 0,1 % für 600 s bei Biofilmen von *P. aeruginosa* SG 81 und *S. epidermidis* RP 62A. Die Plasmabehandlung mittels Fadenelektrode stellte sich dabei effektiver heraus als mittels Flächenelektrode. Unter Berücksichtigung der Zytotoxizität stellte sich eine Anwendungszeit von 60 s für die Fadenelektrode und von 150 s für die Flächenelektrode als die günstigste hinsichtlich Gewebeverträglichkeit und antimikrobieller Wirkung heraus. Diese war vergleichbar mit der Antiseptikabehandlung mit CHX 0,1 %. Auch wenn in dieser Arbeit andere Plasmaquellen angewendet wurden und die CHX-Konzentration 1000fach geringer war, wurde doch die Effektivität der Plasmabehandlung in Korrelation zu dieser Studie bestätigt.

In einer Studie von Hübner et al. (2010b) wurde die Effektivität einer 30 min Behandlung von *P. aeruginosa* SG 81 Biofilmen mit 0,1 %iger CHX Lösung sowie 0,02 %iger und 0,04 %iger PHMB Lösung mit 60 s Argon-Plasmabehandlung mit dem kINPen09[®] verglichen. Alle Behandlungen bewirkten eine signifikante Reduktion der KbE verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, wobei bezüglich der Effektivität der einzelnen Behandlungsarten kein signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte. Auch dieses Ergebnis der guten Wirksamkeit der Argon-Plasma-Behandlung mit dem kINPen09[®] steht in Übereinstimmung zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Das Resultat, dass PHMB 0,02 %, 0,04 % und CHX 0,1 % anders als in dieser Arbeit ebenso effektiv wie die Plasmabehandlung wirkten, lässt sich mit der 200 – 1000fach höheren Konzentration der Antiseptika erklären.

Bei der Behandlung von *P. aeruginosa* SG 81 kam es weder durch die verwendeten Antiseptika noch durch das Plasma zu einer vollständigen Vermehrungshemmung (Tab. 11). Insgesamt stellten sich auch hier die Plasmabehandlungen als deutlich effektiver heraus als die Behandlungen mit den getesteten Antiseptika. Der Beginn der exponentiellen Phase konnte durch die Behandlungen mit HDBD-Ar+1 % O₂-P und kINPen09[®]-Ar-P um 10 h im Vergleich zur Kontrolle und um 4 h im Vergleich zum wirksamsten Antiseptikum OCT 0,0002 % verzögert werden. Das spiegelt sich auch in der AUC und der maximalen OD wider, die bei HDBD-Ar+1 % O₂-P und kINPen09[®]-Ar-P bei 4,68±0,12 und 0,47 bzw. 3,26±2,41 und 0,43 betragen, bei OCT 0,0002 % dagegen 10,23±0,62 und 1,08 (Tab. 10 und 11). Einzig die Behandlungen mit den Gaskontrollen der HDBD waren den Antiseptika nicht überlegen. Wie bei den Behandlungen an den *Candida*-Stämmen führte auch hier eine Sauerstoffzumischung bei HDBD-Ar-P zu einem besseren antimikrobiellen Effekt. Für die kINPen09[®]-Ar-P-Behandlung war das Gegenteil der Fall. Aber auch hier waren die Plasmabehandlungen ihren Gaskontrollen überlegen. Bei den Behandlungen mit Antiseptika war die höhere Konzentration von OCT der geringeren überlegen, für die CHX- und PHMB-Behandlungen gab es diesen Unterschied nicht.

3.2.3 *S. epidermidis* ATCC 12228 und RP 62A

Bei der Behandlung von *S. epidermidis* RP 62A zeigte sich anders als bei den zuvor untersuchten Mikroorganismen keine Überlegenheit der Plasmabehandlung. Hier bewirkten PHMB 0,0001 % und OCT 0,0002 % eine vollständige Vermehrungshemmung. CHX 0,0001 % führte zu einer Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase von 12 h verglichen mit der Kontrolle. Die geringeren Konzentrationen der drei Antiseptika wirkten gleichermaßen weniger effektiv. Bei den Plasmabehandlungen stellte sich die Gaskontrolle des kINPen09[®] mit einer Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase um 17 h und einer maximalen OD von 0,23 als wirksamste heraus, gefolgt von der kINPen09[®]-Ar-P-Behandlung. Die Zugabe von Sauerstoff erzielte beim kINPen09[®] schlechtere Ergebnisse als ohne Sauerstoff. Die HDBD-Behandlungen mit Ar+1 % O₂-Plasma und die Ar-Gaskontrolle waren ähnlich effektiv wie die niedrigen Antiseptikakonzentrationen. Am schlechtesten schnitten die HDBD-Ar+1 % O₂-G und die HDBD-Ar-P-Behandlungen ab.

In der oben erwähnten Studie von Matthes et al. (2013b) war die Plasmabehandlung der Biofilme von *S. epidermidis* RP 62A analog zur vorliegenden Arbeit weniger effektiv als bei der Behandlung von *P. aeruginosa*. In dieser Studie waren über alle

Behandlungszeiten hinweg die Ar-Plasma-Behandlungen denen mit Zugabe von 1 % Sauerstoff überlegen. Ab einer Behandlungsdauer von 150 s war die Behandlung mit Ar-Plasma jener mit CHX 0,1 % überlegen. In der ebenfalls oben erwähnten Studie von Matthes et al. (2013a), wurde ein vergleichbarer antimikrobieller Effekt auf Biofilme von *P. aeruginosa* SG 81 und *S. epidermidis* RP 62A durch eine Luft-Plasma-Behandlung mit SBD im Vergleich zur Antiseptikabehandlung mit CHX 0,1 % ermittelt. Im Unterschied zur vorliegenden Studie, die eine Unterlegenheit der Plasmabehandlung zeigte, lässt sich das abweichende Ergebnis von dieser Arbeit durch die Anwendung anderer Plasmaquellen erklären.

In einer Studie von Bürgers et al. (2012) war die Behandlung mit CHX 0,2 % bei *S. epidermidis* nicht effektiv, allerdings wurde dabei der Stamm AF 270147 verwandt. Auf Grund der Ergebnisse mit dem stark biofilmbildenden Stamm *S. epidermidis* RP 62A wurde entschieden, die Untersuchungen des schlecht biofilmbildenden Stamms *S. epidermidis* ATCC 12228 ohne Plasmabehandlung durchzuführen, da Plasmabehandlungen prädestiniert für Biofilmbehandlungen sind und keine stärkere Widerstandsfähigkeit gegenüber Plasma bei diesem Stamm erwartet wurde. Bei Behandlungen mit den Antiseptika führte die Behandlung mit OCT 0,0002 % wie bei dem RP 62A-Stamm zu einer vollständigen Vermehrungshemmung. Die Behandlung mit PHMB 0,0001 % führte beim ATCC-Stamm nicht wie bei dem RP 62A zu einer vollständigen Hemmung der Proliferation, sondern verzögerte den Beginn der Vermehrungsphase nur um 5 h im Vergleich zur Kontrolle bei einer maximalen OD von 0,46. Da der ATCC-Stamm anders als der RP-Stamm schlechter Biofilme bildet (Gill et al. 2005) und daher als leichter angreifbar erschien, war dieses Ergebnis nicht zu erwarten. Möglicherweise spielen hier weitere Virulenzfaktoren eine Rolle wie die Methicillinresistenz (Gill et al. 2005) oder spezifisch erworbene Resistenzmechanismen. Die zweiteffektivste Behandlung wurde durch CHX 0,0001 % mit einer Verzögerung des Einsetzens der Vermehrung von 13 h im Vergleich zur Kontrolle erzielt. Die niedrigeren Konzentrationen waren jeweils weniger effektiv. Während OCT 0,00005 % noch zu einer Verzögerung des Vermehrungsbeginns von 8 h führte, waren es bei der niedrigen Konzentration von CHX und PHMB nur noch 3 bzw. 0,5 h. Zur Behandlung von *S. epidermidis* RP 62A erwiesen sich die höheren Antiseptikakonzentrationen als wirkungsvoller im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen.

3.2.4 *S. mutans* DMS 20532

Die Behandlung von *S. mutans* zeigte in der Vorbereitung der Hauptversuche eine Besonderheit. Hier gab es Differenzen im Verlauf der Vermehrung, so dass die Kurven anhand der optischen Dichtemessungen für die Behandlungen mit CHX und kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-G bei 0,12 und bei den HDBD-Behandlungen ihren Ausgangswert zwischen 0,22 und 0,28 hatten, während der Ausgangswert der anderen Behandlungen entsprechend der Kontrolle bei 0,06 lag. Der Vergleich der AUC und der maximalen OD kann daher nur unter den Behandlungen erfolgen, die zum Start die gleiche OD der Kontrolle haben. Der Beginn der exponentiellen Phase ist jedoch für alle Behandlungen ein Merkmal, das auch in diesem Fall für einen Vergleich genutzt werden kann. Die Behandlung mit der niedrigen PHMB-Konzentration stellte sich in Bezug auf die Verzögerung der Vermehrung als die effektivste heraus mit einer max. OD von 0,31. Ähnlich wirksam war PHMB 0,0001 % und OCT 0,0002 % mit einer max. OD von 0,34 bzw. 0,32. Alle drei konnten den Beginn der exponentiellen Phase um 13,5 h im Vergleich zur Kontrolle hinauszögern. Die geringere Konzentration von OCT war etwas weniger wirkungsvoll mit einer Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase um 11,5 h. Die Plasmabehandlung mit dem kINPen09[®]-Ar+1 % O₂-P war jene, die den niedrigsten AUC und geringsten max. OD-Wert von 0,24 aufwies, gefolgt von kINPen09[®]-Ar-P ohne Sauerstoffzufuhr. Die Gaskontrollen schnitten schlechter ab. Im Vergleich der HDBD-Behandlungen untereinander zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Zwar hatte hier die Plasmabehandlung ohne Zuführung von Sauerstoff in Bezug auf die Verzögerung des Beginns der exponentiellen Phase von 3 h im Vergleich zur Kontrolle auf Grund der geringeren max. OD gegenüber der Behandlung mit Sauerstoff leichte Vorteile, die geringere OD wurde aber nach 32 h durch die Behandlung mit Sauerstoffzufuhr erreicht. Die Gaskontrollen schnitten jeweils wieder etwas schlechter ab. Die geringste Wirkung in Bezug auf den Beginn der exponentiellen Phase wurde durch die CHX-Konzentrationen erzielt, die sogar noch 30 min vor der Kontrolle lag.

In einer Studie von Koban et al. (2011) mit Biofilmen des gleichen *S. mutans* DSM 20523-Stamms wurde unter anderem der antimikrobielle Effekt durch Behandlungen von Argonplasma mittels kINPen09[®] und HDBD mit CHX 0,1 % bei einer Einwirkzeit von 1, 2, 5 und 10 min verglichen. CHX zeigte einen sehr starken antimikrobiellen Effekt, der den der kINPen09[®]- und HDBD- Behandlungen übertraf. Beim kINPen09[®] ergab die kürzeste Behandlungsdauer von 1 min den größten Effekt. Bei der HDBD-Behandlung stieg der Effekt mit der Einwirkungszeit mit der stärksten Reduktion nach 10 min. Die ungleiche Wirksamkeit von CHX zwischen den beiden Studien könnte durch die Konzentrationsdifferenz des Faktors 1000 erklärt werden.

Ein ähnliches Ergebnis ergab eine Studie von Sladek et al. (2007), die den Effekt einer 60 s Niedertemperaturplasma-Behandlung mittels einer Plasmanadel und 10 min CHX-Behandlung auf die Vermehrung von *S. mutans* Biofilmen untersuchte. Hier zeigte sich für Plasma nur ein Effekt kurze Zeit postinterventionell, nach 24 h wurde wieder eine Vermehrung beobachtet. Bei der Behandlung mit CHX wurde die Vermehrung über 24 h inhibiert.

3.2.5 *S. sanguinis* DSM 20068

Die Behandlung von *S. sanguinis* DSM 20068 wurde ausschließlich mit Plasma bzw. deren Gaskontrollen durchgeführt. Als Kontrollkurve wurde jene aus den Vorversuchen übernommen, da aufgrund von Messfehlern die eigentliche Kontrolle verworfen werden musste. Möglicherweise führten Unregelmäßigkeiten in der Anzucht des Testorganismus dazu, dass zum Nullpunkt für die unterschiedlichen Behandlungen differente OD-Werte mit einer Schwankungsbreite von 0,08 bei der kINPen09[®]-Ar-G bis 0,27 bei der HDBD-Ar-G-Behandlung vorlagen. Daher können die Auswertungen der AUC und der maximalen OD nicht zum Wirksamkeitsvergleich herangezogen werden, da bei einer höheren Anfangszellzahl aufgrund der exponentiellen Vermehrung der Bakterien innerhalb einer Zellteilungsphase wesentlich mehr Bakterienzellen entstehen können als bei einer geringeren Anfangszellzahl. Einzig die Verzögerung des Beginns der exponentiellen Vermehrungsphase im Vergleich zur Kontrolle kann in diesem Fall zum Effektivitätsvergleich verwandt werden. Hier zeigte die Plasmabehandlung mit dem kINPen09[®] die besten Werte bei einer Verzögerung von 11 h, gefolgt von der entsprechenden Behandlung mit Zufuhr von 1% Sauerstoff bei einer Verzögerung von 10 h. Die Gaskontrollen des kINPen09[®] verzögerten den Beginn wie die HDBD-Ar-P-Behandlung und deren Gaskontrolle um 6 h. Die geringste Verzögerung des Vermehrungsbeginns mit 4 h war durch die HDBD-Ar+1 % O₂-P zu eruieren, gefolgt von deren Gaskontrolle. Die Plasmabehandlung mit dem kINPen09[®] ist demnach der mit HDBD überlegen. Eine Beimischung von Sauerstoff erbrachte keinen Wirksamkeitsvorteil.

Eine Studie von Gorynia et al. (2013), die die Biofilmreduktion von *S. sanguinis* durch eine 180 s Argonplasmabehandlung mit dem kINPen09[®] untersuchte, zeigte eine signifikante Reduktion des Biofilms verglichen mit der Kontrolle. Übertragen auf den Einfluss der Vermehrungsverzögerung, der in dieser Arbeit auf *S. sanguinis* nachgewiesen werden konnte, lässt sich die Wirksamkeit der Argonplasmabehandlung mit dem kINPen09[®] bestätigen.

In der zuvor erwähnten Studie von Bürgers et al. (2012) wurde auch die Effektivität einer 60 s Behandlung mit CHX 0,2 % auf *S. sanguinis* DSM 20068 untersucht und als wirksam zur Behandlung der Biofilme eruiert.

3.2.6 Schlussfolgerung

Für den Wirksamkeitsvergleich zwischen TTP und den Antiseptika ist zu berücksichtigen, dass die Antiseptika über den gesamten Untersuchungszeitraum auf die Vermehrung der Mikroorganismen einwirken konnten, die TTP-Behandlungen aber nur für 60 s erfolgten. Bei wiederholten Anwendungen von TTP oder längeren Einwirkungszeiten ist es denkbar, dass bei den durchgeführten Untersuchungen, bei denen TTP den Antiseptika unterlegen war, mindestens ein gleicher Effekt in der Wirkungsweise eintreten könnte, wie es in anderen Studien nachgewiesen werden konnte (Sladek et al. 2007; Koban et al. 2011).

In Hinblick auf die Wirksamkeit der Plasmaanwendungen erwies sich die HDBD-Behandlung mit Zumischung von 1 % Sauerstoff bei den *Candidae*-Spezies als die effektivste. Bei den anderen getesteten Mikroorganismen war die Behandlung mit dem kINPen09[®] effektiver. Die Zumischung von 1 % Sauerstoff erbrachte dabei keine Effektivitätssteigerung. Der vermehrungshemmende Effekt der Gaskontrollen, der bei *S. epidermidis* RP 62A der Plasmabehandlung mit dem kINPen09[®] überlegen war, lässt sich möglicherweise mit den Austrocknungseffekten des Gasstroms auf die Mikroorganismen erklären (Koban et al. 2009), der damit scheinbar einen nicht zu unterschätzenden Anteil an der Vermehrungsverzögerung oder -hemmung der Plasmabehandlung hat.

Höhere Antiseptikakonzentrationen waren niedrigeren Konzentrationen mit Ausnahme der *S. mutans*-Anwendung überlegen oder ähnlich effektiv.

Wenngleich sich die Behandlung mit OCT 0,0002 %, dem effektivsten der getesteten Antiseptika, bei *S. epidermidis* wirksamer als die Plasmabehandlungen herausstellte, waren die Plasmabehandlungen der anderen getesteten Mikroorganismen im Vergleich zu den Antiseptika ebenso effektiv oder wirksamer. Aus diesem Ergebnis lässt sich das Potential der Plasmabehandlungen für klinische Anwendungen ableiten.

3.2.7 Fehlerbetrachtung

Ursachen für Unregelmäßigkeiten in den Vermehrungskurven können unterschiedlich sein. So sind abweichende Startkonzentrationen der Erregersuspensionen über oder unter 10^5 KbE/ml möglich. Wie aus den Vorversuchen ersichtlich, könnten niedrigere Konzentrationen zu einer Verzögerung des detektierten Beginns bzw. höhere Konzentrationen zu einem früheren Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase geführt haben. Ferner könnten gleiche Antiseptikakonzentrationen bei gleichen Zeiten für die Plasmabehandlungen zu unterschiedlich starken Wirkungen bei abweichenden Konzentrationen von Mikroorganismen geführt haben. Eine um wenige Minuten über die 2 h hinaus verlängerte Inkubationszeit des Inokulums könnte die differenten Nullpunkte bei den Behandlungen von *S. mutans* und *S. sanguinis* erklären. Messfehler könnten darüber hinaus trotz sorgfältigen Arbeitens durch Verunreinigungen der Wells, artifizielle Transparenzminderungen im Messstrahlengang, durch Staub oder Wassertröpfchen auch an der Außenseite der Wells oder durch Erschütterungen der Messplättchen beim Einbringen in das Messgerät entstanden sein. Bei den Behandlungen von *S. mutans* und *S. sanguinis* könnte dieser Aspekt die auffällig wellenförmige Zu- und Abnahmen der optischen Dichtewerte mit zeitgleich auftretenden Peaks, die insbesondere bei den Plasmaanwendungen ersichtlich sind, erklären. Als weiterer Aspekt müssen gerätebedingte Messabweichungen der OD vom wahren Wert als mögliche Fehlerquelle in Betracht gezogen werden.

4 Zusammenfassung

Die Verhinderung der Biofilmbildung bzw. deren eradizierende Behandlung spielt in nahezu allen Fachgebieten der Medizin eine große Rolle. Biofilme können sich u. a. auf Implantaten, Kathetern, Endoprothesen, Exoprothesen (z. B. Kontaktlinsen), Beatmungsgeräten, Inhalatoren oder auf Wundoberflächen bilden und sind für die betroffenen Patienten nicht nur in Bezug auf eine längere Krankenhausverweildauer, sondern auch durch eine mögliche vitale Bedrohung von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der Antiseptika Chlorhexidindigluconat (CHX 0,0001 % u. 0,00000625 %), Polihexamethylenbiguanid (PHMB 0,0001 % u. 0,000025 %) und Octenidinhydrochlorid (OCT 0,0002 % u. 0,00005 %) mit gewebekompatiblen Atmosphärendruckplasmen (TTP) mit dem Edelgas Argon als Trägergas mit und ohne Zumischung von 1% Sauerstoff, generiert mit dem kINPen09[®] und einer Hohlelektroden-Dielectric-Barrier Discharge Plasmaquelle (HDBD) sowie der alleinigen Gasbehandlung (Trägergas ohne Plasmagenerierung) in Bezug auf die Vermehrungshemmung bzw. Eradikation von *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* SC 5314, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* SG 81, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* RP 62A, *S. mutans* DSM 20523 und *S. sanguinis* DSM 20068 untersucht. Die Antiseptika wirkten über den gesamten Untersuchungszeitraum von 32 h auf die Mikroorganismen ein, die TTP-Behandlungen nur 60 s. Die Vermehrung der Mikroorganismen wurde alle 30 min anhand der optischen Dichte der Testkulturen gemessen und die Fläche unter dem resultierenden Graphen (Area under the curve, AUC) charakterisiert.

Bei *C. albicans* ATCC 10231 und SC 5314 wurde die Vermehrung vollständig von OCT 0,0002 % und der Plasmabehandlung mit HDBD mit Sauerstoffzuführung gehemmt. Die HDBD- und kINPen09[®]- Behandlungen ohne Sauerstoffzufuhr waren beim ATCC-Stamm nur unwesentlich weniger effektiv. Die restlichen Antiseptika zeigten nur eine geringe Wirkung.

Bei der Behandlung von *P. aeruginosa* SG 81 kam es weder durch die verwendeten Antiseptika noch durch das Plasma zu einer vollständigen Vermehrungshemmung. Insgesamt stellten sich hier die Plasmabehandlungen als deutlich effektiver heraus als die Behandlungen mit den Antiseptika.

Auch bei *P. aeruginosa* ATCC 9027 zeigte die Behandlung mit den Antiseptika einen geringeren Effekt.

Im Ganzen reagierten die gramnegativen *P. aeruginosa* in diesen Versuchen am wenigsten empfindlich auf die antiseptischen Behandlungen.

Bei der Behandlung von *S. epidermidis* RP 62A bewirkten die Antiseptika PHMB 0,0001 % und OCT 0,0002 % eine vollständige Vermehrungshemmung. Die Argongaskontrolle und die Plasmabehandlung mit dem kINPen09[®] waren ebenso wie die Behandlung mit CHX 0,0001 % etwas weniger wirksam.

Beim nicht biofilmbildenden ATCC 12228 Stamm von *S. epidermidis*, der nicht mit Plasma behandelt wurde, führte nur OCT 0,0002 % zu einer vollständigen Vermehrungshemmung.

Bei *S. mutans* DSM 20523 konnte keine der untersuchten antiseptischen Behandlungen zu einer vollständigen Vermehrungshemmung führen. Am effektivsten stellten sich die Behandlungen mit OCT, PHMB und die Plasmaanwendung mit dem kINPen09[®] ohne und mit 1 % Sauerstoffbeimischung heraus.

Die Behandlung von *S. sanguinis* DSM 20068 wurde ausschließlich mit Plasma bzw. deren Gaskontrollen durchgeführt. Hier waren die Plasmabehandlungen mit dem kINPen09[®] und deren Gaskontrollen den HDBD-Behandlungen überlegen.

Von allen getesteten Antiseptika stellte sich Octenidin 0,0002 % als das am breitesten wirksame und effektivste Antiseptikum heraus. Bei der Behandlung der *Candida*- und *S. epidermidis*-Stämme führte dies zu einer vollständigen Hemmung der Proliferation bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 32 h. CHX 0,0001 % und PHMB 0,0001 % unterschieden sich bis auf die Behandlung von *S. epidermidis* RP 62A und *S. mutans* DSM 20523 mit der Überlegenheit für PHMB 0,0001 % nicht in ihrer Wirksamkeit.

Die Plasmabehandlungen von 60 s waren mit Ausnahme von *S. epidermidis* den über den gesamten Untersuchungszeitraum einwirkenden Antiseptika ebenbürtig oder signifikant überlegen. Die Behandlung mit TTP könnte damit eine wirksame Alternative oder Ergänzung zu den herkömmlichen Antiseptika darstellen, um z.B. die Vermehrung von Mikroorganismen in einer infizierten Wunde zu hemmen und somit die Immunabwehr zu unterstützen und Entzündungen zu verzögern oder zu verhindern.

5 Summary

The prevention of biofilm-growth or their erased treatment acts a part in nearly every subject of medicine. They can form on implants, catheters, endoprosthesis, exoprosthesis (e.g. contact lenses), respirators, inhalators or surfaces of wounds. To the affected patients biofilms are not only relevant related to an extended retention time in hospital but also because of a possible vital threat.

In this paper the effectivity of the chemical antiseptics Chlorhexidine digluconate (CHX 0,0001 % and 0,0000625 %), Polyhexanide (PHMB 0,0001 % and 0,000025 %) and Octenidine hydrochloride (OCT 0,0002 % and 0,00005 %) were compared to tissue tolerable plasma (TTP) with argon carrier gas with and without admixture of 1 % oxygen, generated by the kINPen09[®] and a dielectric barrier discharge hollow electrode (HDBD) and a simple argon gas treatment without the generation of plasma related to the growth inhibition respectively eradication of *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* SC 5314, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* SG 81, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* RP 62A, *S. mutans* DSM 20523 and *S. sanguinis* DSM 20068. The antiseptics affected the microorganisms over the whole period of examination by 32 h, TTP only 60 s. The growth of the microorganisms was measured every 30 min with the help of the optical density and characterized with the area under the curve (AUC).

The growth of *C. albicans* ATCC 10231 and SC 5314 completely inhibited by OCT 0,0002 % and the plasma treatment by HDBD with the admixture of oxygen. The treatment by HDBD and kINPen09[®] without the admixture of oxygen was nearly as effective on the ATCC strain. The rest of the antiseptics had only a little impact.

Neither the plasma nor the antiseptics could achieve complete growth inhibition of *P. aeruginosa* SG 81. Considering all treatments it can be concluded that in total the application of plasma turned out to be significantly more effective than the treatment with antiseptics. This also applies for *P. aeruginosa* ATCC 9027 where the treatment with antiseptics showed a smaller effect.

In the treatment of *S. epidermidis* RP 62A a complete growth inhibition could be achieved by using the antiseptics PHMB 0,0001 % and 0,0002 % OCT. The argon gas control and plasma treatment with kINPen09[®] as well as the treatment with CHX 0,0001 % was less effective.

The gramnegative *P. aeruginosa* was the most resistant to the antiseptic treatments.

In the non-biofilm-forming strain of *S. epidermidis* ATCC 12228, which was not treated with plasma, only OCT 0,0002 % led to a complete growth inhibition.

None of the investigated antiseptic treatments could lead to a complete inhibition growth of *S. mutans* DSM 20523. The most effective treatments resulted from using OCT, PHMB and plasma application with the kINPen09[®] with and without oxygen admixture.

The treatment of *S. sanguinis* DSM 20068 was carried out exclusively with plasma or their gas controls, whereby the plasma treatments with the kINPen09[®] and their gas controls were superior to the HDBD treatments.

Octenidine 0,0002 % turned out to be the most and wide effective antiseptic from all of the examined ones. It led to a complete inhibition growth of the *Candidae* and *S. epidermidis* strains by the end of the 32 h observation period. CHX 0,0001 % and PHMB 0,0001 % didn't differ in their efficacy, except in the treatment of *S. mutans* DSM 20523 and *S. epidermidis* RP 62A with a predominance for PHMB 0,0001 %.

The plasma treatments for 60 s with the exception of *S. epidermidis*, were over the entire study period at least equal or significantly superior to antiseptics. The treatment with TTP could thus represent an effective alternative or supplement to conventional antiseptics, for example, to inhibit the growth of microorganisms in an infected wound and consequently supporting the immune system and delay or prevent inflammation.

6 Literaturverzeichnis

- Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Quian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ (2002) Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. PNAS 99(22): 14434-14439.
- Bender C, Partecke I, Kindel E, Döring F, Lademann J, Heidecke CD, Kramer A, Hübner NO (2011) The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. Toxicology in Vitro 25(2): 530-537.
- Bender C, Hübner NO, Weltmann KD, Scharf C, Kramer A (2012) Tissue tolerable plasma and polyhexanide: Are synergistic effects possible to promote healing of chronic wounds? In: Machala Z, Hendsel K, Akishev Y (eds.) Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security. Springer Dordrecht (Netherlands): 312-334.
- Blaschke-Hellmessen R, Schönian G (2001) Allgemeine Medizinische Mykologie. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie. Urban & Fischer München Jena: p665-680.
- Büchner T, Fegeler W, Bernhardt H, Brockmeyer N, Duswald KH, Herrmann M, Heuser D, Jehn U, Just-Nübling G, Karthaus M, Maschmeyer G, Müller FM, Müller J, Ritter J, Roos N, Ruhnke M, Schmalreck A, Schwarze R, Schwesinger G, Silling G (2002) Treatment of severe candida infections in high-risk-patients in Germany: Consensus formed by a panel of interdisciplinary investigators. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21: 337-352.
- Bültemann A, Gerber V, Protz K (2009) octenisept® Wundkompendium: p35. http://www.schuelke.com/download/pdf/cde_ide_octenisept_wundkompendium_fol.pdf
- Bürgers R, Witte C, Hahnel S, Gosau M (2012) The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. Arch Oral Biol 57(7): 940-947.
- Calderone AR, Fonzi AW (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiol 9(7): 327-335.
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun 37: 318-326.

- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dagsputa M, Marrie TJ(1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41: 435-464.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418): 1318-1322.
- Cuéllar-Cruz M, López-Romero E, Villagómez-Castro J C, Ruiz-Baca E (2012) *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol* 7: 755-771.
- Daeschlein G, Assadian O, Luther C, Kloth PT, Meinel C, Ney F, Kramer A (2007a) Antibacterial activity of positive and negative polarity low-voltage pulsed current (LVPC) on six typical grampositive and gramnegative bacterial pathogens of chronic wounds. *Wound Rep Reg* 15: 399-403.
- Daeschlein G, Mumcuoglu KY, Assadian O, Hoffmeister B, Kramer A (2007b) In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions. *Skin Pharmacol Physiol* 20: 112-115.
- Daeschlein G, Scholz S, Arnold A, von Woedtke T, Kindel E, Niggemeier M, Weltmann KD, Jünger M (2010a) In vitro activity of atmospheric pressure plasma jet (APPJ) plasma against clinical isolates of *Demodex folliculorum*. *Plasma Sci* 38(10): 2969-2973.
- Daeschlein G, von Woedtke T, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Junger M (2010b) Antibacterial activity of an atmospheric pressure plasma jet against relevant wound pathogens in vitro on a simulated wound environment. *Plasma Process Polym* 7(3-4): 224-230.
- Daeschlein G, Scholz S, von Woedtke T, Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Jünger M (2011) In vitro Killing of Clinical Fungal Strains by Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma Jet. *Plasma Sci* 39(2): 815-821.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
- diagnostika heipha Produktinformation CASO-Bouillon: http://www.heipha.de/files/product/de/03074e-2-0506_CASO-LI.pdf
- Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition: Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Agar, Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Broth. http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/242820.pdf
- Dissemond J, Assadian O, Gerber V, Kingsley A, Kramer A, Leaper DJ, Mosti G, Piatkowski de Grzymala A, Riepe G, Risse A, Romanelli M, Strohal R, Traber J, Vassel-Biergans A, Wild T, Eberlein T (2011) Classification of wounds at risk and

- their antimicrobial treatment with polihexanide: A practice-oriented expert recommendation. *Skin Pharmacol Physiol* 24: 245-255.
- Donlan RM (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerg infect dis* 7(2): 277-281.
- Donaldson SH, Boucher RC (2003) Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 9: 486-491.
- Döring G (1987) Die Bedeutung der Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa* für akute und chronische *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen. *Infect* 15(1): 47-50.
- Drenkard E, Ausubel FM (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416(6882): 740-743.
- Eckart WU (2001) Aufbruch in die Moderne – die Medizin des 19. Jahrhunderts. In: Eckart WU (Hrsg) *Geschichte der Medizin*. Springer Berlin: 249-318.
- Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke T, Brandenburg R, Hagen T von dem, Weltmann KD (2011) Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys D Appl Phys* 44: 013002.
- Fluhr J, Sassning S, Lademann O, Darvin M, Schanzer S, Kramer A, Richter H, Sterry W, Lademann J (2011) In vivo Skin Treatment with tissue tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. *Exp Dermatol* 21(2): 130-134.
- Fricke K, Koban I, Tresp H, Jablonowski L, Schröder K, Kramer A, Weltmann KD, von Woedtke T, Kocher T (2012) Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms. *PLoS One* 7(8): e42539 doi:10.1371/journal.pone.0042539.
- Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A (2008) Applied Plasma Medicine. *Plasma Process Polym* 5(6): 503-533.
- Garber G (2001) An overview of fungal infections. *Drugs* 61: 1-12.
- Gilbert P (1995) The value of in vitro models to the study of biofilms. In: Wimpenny J, Handley P, Gilbert P, Lappin-Scott H (Hrsg) *Life and death of biofilm*. BioLine Cardiff: 13-16.
- Grobe S, Wingender J, Trüper HG (1995) Characterisation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J Appl Microbiol* 79: 94-102.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM

- (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187(7): 2426-2438.
- Gorynia S, Koban I, Matthes R, Welk A, Hübner NO, Kocher T, Kramer A (2013) In vitro efficacy of cold atmospheric pressure plasma on *S. sanguinis* biofilms in comparison of two test models. *GMS Hyg Infect Control* 8(1): Doc01 (20130429).
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat rev Microbiol* 2(2): 95-108.
- 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 Pharmacol Physiol* 23(6): 328-332.
- Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz WGI, Zimmermann JL, Shimizu T, Karrer S (2010) Plasma-Medizin: Anwendungsmöglichkeiten in der Dermatologie. *J Dtsch Dermatol Gesellsch* 8(12): 968-977.
- Hodges NA, Gordon CA (1991) Protection of *Pseudomonas aeruginosa* against ciprofloxacin and beta-lactams by homologous alginate. *Antimicrob. Agents Chemother* 35(11): 2450–2452.
- Hof H, Dörries R (2005) Spezielle Bakteriologie In: Hof H, Dörries R (Hrsg.) *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme Stuttgart: 297-455.
- Hoffmann G (2006) Wassergefiltertes Infrarot A (wIRA) zur Verbesserung der Wundheilung. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 1(1): Doc20 (20060830).
- Holtmann H, Bobkowski M (2008) Spezielle Mykologie In: *Basics Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene*. Urban & Fischer München: 86-89.
- Hübner NO, Kramer A (2010a) Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. *Skin Pharm Physiol* 23(1): 17-27.
- Hübner NO, Matthes R, Koban I, Rändler C, Müller G, Bender C, Kindel E, Kocher T, Kramer A (2010b) Efficacy of Chlorhexidine, Polihexanid and Tissue-Tolerable Plasma against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Grown on Polystyrene and Silicone Materials. *Skin Pharm Physiol* 23(1): 28-34.
- Hübner NO, Siebert J, Kramer A (2010c) Octenidine Dihydrochloride, a Modern Antiseptic for Skin, Mucous Membranes and Wounds. *Skin Pharm Physiol* 23(5): 244-258.

- Hülsemann W, Habenicht R (2011) Toxische Schäden nach Wundspülung mit Octenidin-haltigem Antiseptikum. *Obere Extremität* 6: 35-39.
- Iza F, Kim GJ, Lee SM, Lee JK, Walsh JL, Zhang YT, Kong MG (2008) Microplasmas: Sources, Particle Kinetics, and Biomedical Applications. *Plasma Process. Polym* 5(4): 322-344.
- Kajfasz JK, Martinez AR, Rivera-Ramos I, Abranches J, Koo H, Quivey Jr. RG, Lemos JA (2009) Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 191(7): 2060-2068.
- Koban I, Hübner NO, Matthes R, Welk A, Kindel E, Weltmann KD, Kramer A, Kocher T (2009) Antiseptische Wirksamkeit ausgewählter Wirkstoffe und von tissue tolerable plasma (TTP) auf *C. albicans*-Biofilme – hat der Reifegrad des Biofilms einen Einfluss? *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 4(2): 1-8: Doc09.
- Koban I, Jablonowski L, Matthes R, Meisel P, Schröder K, Fricke K (2010a) Killing and removal of dental biofilms from titanium implant surfaces. *Reguläre Beiträge (BMT 2010)*. Rostock-Warnemünde, Germany.
- Koban I, Matthes R., Hübner NO, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, Sietmann R, Kindel E, Weltmann KD, Kramer A, Kocher T (2010b) Treatment of *Candida albicans* biofilms with low temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New J Physics* 12: 1-16; 073039.
- 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. *J Clin Periodontol* 38(10): 956-965.
- Koban I, Matthes R, Hübner N, Welk A, Sietmann R, Lademann J, Kramer A, Kocher T (2012) XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* 7(1): 1-10. Doc06 (20120404).
- Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, van Dijk J, Zimmermann JL (2009) Plasma medicine: an introductory review. *New J Physics* 11: 115012.
- König DP, Schierholz JM, Hilgers RD, Bertram C, Perdreau-Remington F, Rutt J (2001) In vitro adherence and accumulation of *Staphylococcus epidermidis* RP A and *Staphylococcus epidermidis* M7 on four different bone cements. *Arch Surg* 386: 328-332.
- Kramer A (2001) Antiseptika und Händedesinfektionsmittel. In: Korting HC, Sterry W (Hrsg) *Therapeutische Verfahren in der Dermatologie*. Blackwell Wissenschaft Berlin: 273-294.
- Kramer A, Daeschlein G, Kammerlander G, Andriessen A, Aspöck C, Bergemann R, Eberlein T, Gerngross H, Görtz G, Heeg P, Jünger M, Koch S, König B, Laun R,

- Peter RU, Roth B, Ruef Ch, Sellmer W, Wewalka G, Eisenbeiß W (2004) Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen für die Wundantiseptik. Hyg Med 5: 147-157; ZfW 3: 110-120.
- Kramer A, Hübner NO, Weltmann KD, Lademann J, Ekkernkamp A, Hinz P, Assadian O (2008a) Polypragmasia in the therapy of infected wounds – conclusions drawn from the perspectives of low temperature plasma technology for plasma wound therapy. GMS Krankenhaushyg Interdisziplinär 3(1): Online Doc13 (20080311).
- Kramer A, Reichwagen S, Widulle, Heldt P (2008b) Guanide und Biguanide. In: Kramer A, Assadian O (Hrsg) Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Thieme Stuttgart: 788-798.
- Kramer A, Roth B (2008c) Polihexanid. In: Kramer A, Reichwagen S, Widulle H, Heldt P Guanidine und Biguanide In: Kramer A, Assadian O (Hrsg) Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Thieme Stuttgart: 789-793.
- Kramer A, Hübner NO, Assadian O, Mulder G (2010a) Polihexanide – perspectives on clinical wound antiseptics. Skin Pharmacol Physiol 23(1): 1-3.
- Kramer A, Assadian O, Below H, Bender C, Hammann A, Hübner NO, Koban I, Kocher T, Lademann J, Matthes R, Weltmann KD (2010b) Perspektiven der Plasmamedizin durch Anwendung von gewebekompatiblen Atmosphärendruckplasmen (Tissue Tolerable Plasma, TTP). Vakuum Forsch Prax 22(2): 33-38.
- Kramer A, Lademann J, Bender C, Sckell A, Hartmann B, Münch S, Hinz P, Ekkernkamp A, Matthes R, Koban I, Partecke I, Heidecke CD, Masur K, Reuter S, Weltmann KD, Koch S, Assadian O (2013a) Suitability of tissue tolerable plasmas (TTP) for the management of chronic wounds. Clinical Plasma Medicine 1: 11-18.
- Kramer A, Assadian O, Below H, Willy C (2013b) Wound antiseptics today – on overview. In: Willy C (eds) Antiseptics in surgery – update 2012. Lindquist Berlin: 85-111.
- Lademann O, Kramer A, Richter H, Patzelt A, Meinke M, Roewert-Huber J, Czaika V, Weltmann KD, Hartmann B, Koch S (2011) Antisepsis of the follicular reservoir by treatment with tissue-tolerable plasma (TTP). Laser Phys Lett: 1-5; doi10.1002/lapl.201010123.
- Lademann J, Richter H, Alborova A, Humme D, Patzelt A, Kramer A, Weltmann KD, Hartmann B, Ottomann C, Fluhr JW, Hinz P, Hübner NO, Lademann O (2009)

- Risk assessment of the application of a plasma-jet in dermatology. *J Biomed Optics* 14(5): 1-6; doi10.1117/1.3247156. Pubmed-ID: 19895127.
- Lademann O, Richter H, Patzelt A, Alborova A, Humme D, Weltmann KD, Hartmann B, Hinz P, Kramer A, Koch S (2010) Application of a plasma-jet for skin antiseptics: analysis of the thermal action of the plasma by laser scanning microscopy. *Laser Phys Lett* 7(6): 458-462.
- Lademann J, Richter H, Schanzer S, Patzelt A, Thiede G., Kramer A, Weltmann KD, Hartmann B, Lange-Asschenfeldt B (2012a) 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, doi10.1159/000335558.
- Lademann J, Richter H, Patzelt A, Meinke MC, Fluhr J, Kramer A, Weltmann KD, Lademann O +(2012b) Antisepsis of the Skin by Treatment with Tissue-Tolerable Plasma (TTP): Risk Assessment and Perspectives. In: Machala Z, Hensel K, Akishev Y (eds) *Plasma for bio-decontamination, medicine and food security*, NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Springer Dordrecht (Netherlands): 281-291.
- Lademann J, Ulrich C, Patzelt A, Richter H, Kluschke F, Klebes M, Lademann O, Kramer A, Weltmann KD, Lange-Asschenfeldt B (2013) Risk assessment of the application of tissue-tolerable plasma on human skin. *Clinical Plasma Medicine* 1: 5-10.
- Langmuir I (1928) Oscillations in Ionized Gases. *Proc Natl Acad Sci* 14(8): 627–637.
- Lee HW, Park GY, Seo YS, Im YH, Shim SB, Lee HJ (2011) Modelling of atmospheric pressure plasmas for biomedical applications. *J Phys D* 4(5): 1-27.
- Lütticken R, Kaufhold A (1994). Die Familie der Streptococcaceae. In: Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G (Hrsg) *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Stuttgart: 361-377.
- Ma TFC, O`Tool GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9(1): 34-39.
- Madigan MT, Martinko JM (2006) *Brock Biology of Mikroorganism*. 11. Aufl Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River NJ 07458.
- Matthes R, Bender C, Schlüter R, Koban I, Bussiahn R, Reuter S, Lademann J, Weltmann KD, Kramer A, Kaufmann GF (2013a) Antimicrobial efficacy of two surface barrier discharges with air plasma against in vitro Biofilms. *PLoS ONE* 8(7): e70462.
- Matthes R, Koban I, Bender C, Masur K, Kindel E, Weltmann KD, Kocher T, Kramer A, Hübner NO (2013b) Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma-

- jet against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Plasma Proc Polym* 10(2): 161-166; doi: 10.1002/ppap.2011001.
- Morfill GE, Shimizu T, Steffes B, Schmidt HU (2009) Nosocomial infections – a new approach towards preventive medicine using plasmas. *New J Physics* 11: 115019.
- Müller G, Langer J, Siebert J, Kramer A (2014) Residual antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride on reconstructed human epidermis. *Skin Pharmacol Physiol* 27: 1-8.
- Okajima Y, Kobayakawa S, Tsuji A, Tochikubo T (2006) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lens material. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(7): 2971-2975.
- Partecke L I, Evert K, Haugk J, Döring F, Normann L, Diedrich S, Weiss F U, Evert M, Hübner N O, Günter S, Heidecke C-D, Kramer A, Bussiahn R, Weltmann K-D, Pati O, Bender C, von Bernstorff W (2012) Tissue Tolerable Plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 12(1): 473-479.
- Patti JM (2005) Vaccines and immunotherapy for staphylococcal infections. *Intern J Artif Organs* 28(11): 1157-1162.
- Ping X, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z (2007) Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol* 189(8): 3166-3175.
- Produkt-Datenblatt, Hirn-Herz-Glucose Bouillon: http://www.carlroth.de/media/_de-de/usage/X916.pdf
- Pschyrembel W (Hrsg) (2002) *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch* (Band 259). de Gruyter Berlin: 925.
- Reid G (1999) Biofilms in infectious disease and on medical devices. *Int J Antimicrob Agents* 11: 223-226.
- Reuter S, Niemi K, Schulz-von der Gathen V, Döbele HF (2009) Generation of Atomic Oxygen in the Effluent of an Atmospheric Pressure Plasma Jet. *Plasma Sources Sci Technol* 18: 015006\1-9.
- Reuter S, Winter A, Schmidt-Bleker A, Tresp H, Hammer M, Weltmann KD (2012) Controlling the Ambient Air Affected Reactive Species Compositions in the Effluent of an Argon Plasma Jet. *IEEE Trans Plasma Sci Bd* 99: 1-7.
- Ribeiro de Freitas A, Baeza LC, Lecher Faria MG, Dalben Dota KF, Godoy Martinez P, Estivalet Svidzinski TI (2013) Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: Antifungal susceptibility and biofilm production (Abstract). *Rev Iberoam Micol* Jun 25. pii: S 1130-1406(13)00062-4. doi: 10.1016/j.riam.2013.06.004.

- Rupf S, Hannig M, Schäfer B, Schubert A, Lehmann AC, Hofmann T, Schindler A (2009) Antimicrobial activity of non-thermal atmospheric plasma-jet. *Caries Res* 43: 179-244.
- Rupf S, Lehmann A, Hannig M, Schafer B, Schubert A, Feldmann U, Schindler A (2010) Killing of adherent microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *J Med Microbiol* 59: 206-212.
- Rupf S, Al-Muhammad M, Hannig M, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A (2011) In-vitro influence of non-thermal atmospheric plasma treatment on the tooth-composite-interface. IADR/AADR/CADR 89th General Session San Diego, Calif., *J Dent Res* 90, Spec Iss A.
- Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S (2005) Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP 62A. *Infect Immun* 73: 3007-3017.
- Sabouraud Dextrose Agar (7150): http://www.neogen.com/Acimedia/pdf/ProdInfo/7150_PI.pdf
- Sahl HG (2001) Physiologie der Bakterien. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (Hrsg.) *Medizinische Mikrobiologie*. Urban & Fischer München Jena: 171-180.
- Scholtz V, Julák J, Kriha V, Mosinger J, Kopecká S (2007) Decontamination effects of low-temperature plasma generated by corona discharge. Part II: new insights. *Praque Med Rep* 108(2): 128-146.
- Schütt-Gerowitt H, Rüchel R (2001) Spezielle Medizinische Mykologie. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (Hrsg.) *Medizinische Mikrobiologie*. Urban & Fischer München Jena: 681-698.
- Seeliger HPR (1978) *Taschenbuch der medizinischen Bakteriologie*, Ambrosius Barth Leipzig: 103-111.
- Shimizu M, Okuzumi K, Yoneyama A, Kunisada T, Araake M, Ogawa H, Kimura S (2002) In vitro antiseptic susceptibility of clinic isolates from nosocomial infections. *Dermatol* 204(1): 21-27.
- Skrabal PM (2009) *Spektroskopie: Eine methodenübergreifende Darstellung vom UV-bis zum NMR-Bereich*. vdf Zürich: 104-105.
- Sladek REJ, Filoche SK, Sissons CH, Stoffels E (2007) Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. *Lett Appl Microbiol* 45: 318-323.
- Steinmetz I (2009) Nichtfermentierende Bakterien (Nonfermenter): *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*. In: Hahn H, Kaufmann SHE,

- Schulz TF, Suerbaum S (Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6. Aufl, Springer Heidelberg: 275-285.
- Stewart PS (1996) Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 40(11): 2517–2522.
- Strathmann M (2003) Visualisierung und Charakterisierung von extrazellulären polymeren Substanzen in Biofilmen. Der Andere Verlag Osnabrück: 3-160.
- Thermo Fisher Scientific Inc (2007) Evolution 300 und Evolution 600. Benutzerhandbuch.
- Tonks L (1967) Birth of plasma. *Am J Phys* 35(9): 857-858.
- Trautwein A, Kreibitz U, Hüttermann J (2004a) Physik: für Mediziner, Biologen, Pharmazeuten. 6. Aufl, de Gruyter Berlin: 284-285.
- Trautwein A, Kreibitz U, Hüttermann J (2004b) Physik: für Mediziner, Biologen, Pharmazeuten. 6. Aufl, de Gruyter Berlin: 335-337.
- Weltmann KD, Kindel E, Brandenburg R, Meyer C, Bussiahn R, Wilke C, Woedtke T von (2009) Atmospheric pressure plasma-jet for medical therapy: plasma parameters and risk estimation. *Contribut Plasma Phys* 49(9): 631-640.
- Weltmann KD, Woedtke T von (2011) Basic requirements for plasma sources in medicine. *Eur Phys J Appl Phys* 55(1): 1-10.
- Wende K, Strassenburg S, Haertel B, Harms M, Holtz S, Barton A, Masur K, von Woedtke Th, Lindequist U (2013) Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in HaCaT keratinocytes and influences cell physiology. *Cell Biology Internat* 37(10): doi: 10.1002/cbin.10200.
- Woedtke T von, Brandenburg R, Ehlbeck J, Weltmann KD (2008) Neu entwickelte, bisher nicht genormte Sterilisationsverfahren. In: Kramer A, Assadian O (Hrsg.) *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*. Thieme Stuttgart: 105-138.
- Xiaogang Li, Zhun Yan, Jianping Xu (2003) Quantitative variation of biofilms among strains in natural population of *Candida albicans*. *Microbiol* 149(2): 353-362.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig 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.

28.04.2014

Farzana Rebert

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kramer für das herausfordernde Thema und die konstruktive Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. Kohlmann für die statistische Auswertung dankbar.

Ein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Nils-Olaf Hübner für die Unterstützung in der Einarbeitungsphase dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gebührt Dr. Ina Koban und Dr. Rutger Matthes, die zum Entstehen dieser Arbeit einen großen Beitrag geleistet haben und mich jederzeit unterstützt und mir wertvolle Ratschläge gegeben haben. Danke für die Geduld und die freundliche Betreuung.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Hygieneinstituts danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft im Labor.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner lieben Familie aussprechen, die mir das Studium ermöglicht und mich jederzeit unterstützt hat. Meinem Bruder möchte ich ganz herzlich für die vielen Stunden danken, in denen er mir mit guten Ratschlägen und technischer Hilfe zur Seite stand.

Danken möchte ich auch meinem Ehemann für die aufmunternden, liebevollen Worte und die Geduld während der Erstellung der Arbeit.