Technische Universität München Lehrstuhl für Lebensmittelverpackungstechnik

Einsatz eines Atmosphärendruckplasmas zur Entkeimung von lebensmittelrelevanten Verpackungen aus Kunststoff

Peter Muranyi

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H.-Chr. Langowski
2. Univ.-Prof. Dr. U. M. Kulozik
3. Univ.-Prof. Dr. P. Awakowicz

Die Dissertation wurde am 09.01.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.06.2008 angenommen.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand größtenteils im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, FKZ 13N7602ff.) geförderten Projektes zur Erforschung der grundlegenden Wirksamkeit von Gasplasmen für Entkeimungszwecke.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-C. Langowski und Herrn Dr. Dr.-Ing. habil. G. Ziegleder für die wertvollen Anregungen, die ergiebigen Diskussionen sowie die Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Den Herren Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. U. Kulozik und Prof. Dr.-Ing. habil. P. Awakowicz danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme der Koreferate sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. R. F. Vogel für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Hervorheben möchte ich die Hilfe von Herrn Dipl.-Biol. J. Wunderlich, der mir während der gesamten Zeit mit seinem mikrobiologischen Fachwissen zur Seite stand und einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Ich danke allen Mitarbeitern des Fraunhofer Instituts für Verfahrenstechnik und Verpackung für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Besonders meinen Kolleginnen in der Mikrobiologie, Frau. C. Berger und M. Steinbüchl, gebührt Dank für ihre Hilfe im Labor und die vielen guten Vorschläge bei der Versuchsdurchführung. Herrn W. Teichmann danke ich für die zahlreichen Ratschläge seitens der Packstoffanalytik.

Herrn Dipl.-Ing. W. Danzl danke ich für die gute Zusammenarbeit auf kleinstem Raum und die vielen unterhaltsamen Anregungen.

Weiterhin gilt mein Dank den Kollegen vom Fraunhofer Institut für Lasertechnik, vor allem Herrn Dr. M. Heise und Herrn Dipl.-Ing. O. Franken, für die Bereitstellung der Versuchsanlage, die praktische Unterstützung und für ihre fachliche Hilfe auf dem Gebiet der Plasmatechnik.

Herrn Dipl. Ing. H. Halfmann von der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die schnelle und unkomplizierte Anfertigung von REM-Aufnahmen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich die letzten Jahre unterstützt haben und damit sehr zum Erfolg der Dissertation beigetragen haben.

Freising, im Juli 2008

Peter Muranyi

Kurzfassung

Einsatz eines Atmosphärendruckplasmas zur Entkeimung von lebensmittelrelevanten Verpackungen aus Kunststoff

Das Ziel dieser Arbeit war die umfassende Bewertung eines neuartigen Entkeimungsverfahrens plasmabasierten für Verpackungsfolien aus Kunststoff. Dabei handelte es sich um die sog. kaskadierte dielektrische Barrierenentladung (KDBE), welche eine Kombination aus einem UVemittierenden Excimer-Strahler und einem chemisch reaktiven Plasma darstellt. Zu Beginn erfolgten orientierende Versuche mit verschiedenen Prozessgasen, zur Inaktivierung von A. niger- und B. atrophaeus-Sporen. Als sehr effektiv und ökonomisch erwies sich herkömmliche Umgebungsluft, im Vergleich zu den anderen getesteten Gasen (z.B. Argon, Sauerstoff, Stickstoff). Zur Beurteilung der Entkeimungseffizienz dieses Systems unter Verwendung von Umgebungsluft wurden Abtötungskinetiken erstellt, wobei ein breites Spektrum lebensmittelrelevanter Mikroorganismen untersucht wurde. Dabei überzeugte die KDBE durch hohe Inaktivierungsraten. Bei den bakteriellen Endosporen von B. atrophaeus konnten zum Beispiel Reduktionen von mindestens fünf Zehnerpotenzen in einer Sekunde erzielt werden. Neben der Ermittlung der mikrobiziden Leistungsfähigkeit erfolgten Versuche zur Optimierung der Entkeimung gegenüber dem Modellorganismus A. niger, der sich als besonders resistent erwies. Zu diesem Zweck wurden die relative Luftfeuchte des Prozessgases und der integrierte Excimer-Strahler variiert. In beiden Fällen konnten Leistungssteigerungen erreicht werden. Als weiterer Punkt dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit der KDBE auf die Packstoffeigenschaften ausgewählter Kunststoffe untersucht. Insgesamt konnten keine wesentlichen Modifikationen des Materials nachgewiesen werden. Studien zu der biologischen Wirkungsweise der KDBE auf B. atrophaeus Zellen bzw. Endosporen sollten Aufschluss über den Inaktivierungsmechanismus der KDBE geben. Dabei ließen sich verschiedene Schadbilder wie DNS-Schäden oder Strukturveränderungen in der Zellwand beobachten. Zusammenfassend hat sich die kaskadierte Barrierenentladung als vielversprechendes Verfahren für die Entkeimung von Flachfolien erwiesen, bei gleichzeitigem Erhalt der Packstoffeigenschaften.

Schlagworte: Atmosphärendruckplasma, kaskadierte Barrierenentladung, Entkeimung, Excimer-Strahler, *Bacillus atrophaeus*, *Aspergillus niger*, Packstoffe, Luftfeuchte.

Abstract

Plasma sterilization of polymeric food packaging material at atmospheric pressure

The major aim of this work was the evaluation of a new plasma based sterilization method for packaging materials made of plastic. The set-up was the cascaded dielectric barrier discharge (CDBD), which combines generation of intensive monochromatic UV light with a chemically reactive plasma. At first, exploratory analysis was done with different process gases and spores of A. niger and B. atrophaeus. These Investigations proved that air is a very effective and economic process gas in comparison to the other gases (e.g. nitrogen, oxygen, argon). For evaluation of the sterilization efficiency of the CDBD with air, inactivation kinetics of various food related micro-organisms were produced. In the process CDBD has shown high inactivation rates. In case of *B. atrophaeus* endospores, a count reduction of at least $5 \log_{10}$ within one second was achieved. In contrast, A. niger conidiospores have revealed a high resistance against this treatment, hence optimization efforts for this strain were implemented. For these purposes parameters like air humidity and excimer flat lamp were varied and investigated. In both cases an enhancement of sterilization could be observed. A further aspect of this work was the influence of a CDBD treatment on the properties of the packaging material. In this context no essential modifications of the packaging material could be observed. For investigation of the inactivation mechanisms, different experiments about the biological effectiveness of the CDBD on vegetative cells and endospores of B. atrophaeus were done. They showed different kind of damages like destruction of DNA or structural changes of the cell wall. Generally, the studies have shown that optimized CDBD with air as process gas is a promising and effective method for the inactivation of microorganisms on surfaces, by maintaining the characteristics of the material.

Keywords: Atmospheric plasma, cascaded dielectric barrier discharge, sterilization, Excimer flat lamp, *Bacillus atrophaeus*, *Aspergillus niger*, packaging material, air moisture.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Packstoffentkeimung in der Lebensmittelindustrie	1
1.2 Kenntnisstand zur Plasmaentkeimung1.2.1 Remote-Plasmaprozesse1.2.2 Direkte Plasmaprozesse	4 4 6
1.3 Ziel und Inhalt der Arbeit	8
2 STAND DES WISSENS	10
 2.1 Mikrobiologische Grundlagen 2.1.1 Reaktionskinetik der mikrobiologischen Inaktivierung 2.1.2 Anforderungen an die Packstoffentkeimung 2.1.2.1 Mikrobiologische Belastung der Packstoffoberflächen 2.1.2.2 Füllgutspezifische Anforderungen an die Packstoffentkeimung 2.1.2.3 Verfahrenspezifische Aspekte bei der Packstoffentkeimung 2.1.2.4 Anforderung an die Packstoffentkeimung bei der Aseptik 2.1.3 Struktureller Aufbau der Mikroorganismen 2.1.3.1 Struktureller Aufbau vegetativer Bakterienzellen 2.1.3.2 Struktureller Aufbau bakterieller Endosporen 	10 18 18 19 20 23 25 26 29
 2.2 Plasmatechnik 2.2.1 Grundlagen der Plasmatechnik 2.2.2 Klassifizierung nach der Temperatur 2.2.3 Klassifizierung nach dem Druck 2.3.1 Niederdruckplasma 2.3.2 Atmosphärendruckplasma 2.4 Barrierenentladung 2.4.1 Dielektrische Barrierenentladung (DBE) 2.2.4.2 Kaskadierte dielektrische Barrierenentladung (KDBE) 2.2.4.3 Einfluss des Prozessgases auf die Entkeimungseffizienz der dielektrischen Barrierenentladung 	32 38 42 43 44 45 47 50
 2.3 Wirkmechanismen in einem Plasma 2.3.1 Ultraviolette Strahlung 2.3.2 Chemisch reaktive Radikale 2.3.3 Ladungsträger 	54 54 58 59
 2.4 Polymere Kunststoffe in der Lebensmittelindustrie 2.4.1 Polyethylen (PE) 2.4.2 Polypropylen (PP) 2.4.3 Polystyrol (PS) 	60 60 62 63

3 MATERIAL UND METHODEN 6 3.1 Mikrobiologische Materialien und Methoden 6 3.1.1 Testmethode: Keimreduktionstest (Count-Reduction-Test) 6 3.1.2 Verwendete Mikroorganismen 6 3.1.2 Vegetative Mikroorganismen 6 3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen 7 3.1.4 Sprühapparatur 7 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 7 3.1.6 Keimzahlbestimmung 7 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 7 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 7 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 7 3.1.8 Färbemethode nach Gram 7 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 7 3.2.1 Plasmaanlage 7 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 8 3.2.3 Plasmabehandlung 8 3.2.3.1 Eigene Experimente 3 3.2.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 7 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 8 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 8 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.4.1 Verwendete Kunststoffe	2.4.4 Polyethylenterephthalat (PET)	64
3.1 Mikrobiologische Materialien und Methoden 6 3.1.1 Testmethode: Keimreduktionstest (Count-Reduction-Test) 6 3.1.2 Verwendete Mikroorganismen 6 3.1.2.1 Sporenbildende Mikroorganismen 6 3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen 6 3.1.4 Sprühapparatur 7 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 7 3.1.6 Keimzahlbestimmung 7 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 7 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 7 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 7 3.1.8 Färbemethode nach Gram 7 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 7 3.2.1 Plasmaanlage 7 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 8 3.2.3 Plasmabehandlung 8 3.2.3 Leigene Experimente 8 3.2.4 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 8 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 8 3.4 Verwendete Kunststoffe 9 3.4.1 Verwendete Kunststoffe	3 MATERIAL UND METHODEN	67
3.1.1 Testmethode: Keimreduktionstest (Count-Reduction-Test) 6 3.1.2 Verwendete Mikroorganismen 3.1.2.1 Sporenbildende Mikroorganismen 3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen 3.1.4 Sprühapparatur 3.1.4 Sprühapparatur 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 3.1.6 Keimzahlbestimmung 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl 3.4.3 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl	3.1 Mikrobiologische Materialien und Methoden	67
3.1.2 Verwendete Mikroorganismen 3.1.2.1 Sporenbildende Mikroorganismen 3.1.2.1 Sporenbildende Mikroorganismen 3.1.2.2 Vegetative Mikroorganismen 3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen 3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen 3.1.4 Sprühapparatur 3.1.4 Sprühapparatur 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 3.1.6 Keimzahlbestimmung 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl 3.4.2 Reibungszahl 3.4.2 Operlächenenergie	3.1.1 Testmethode: Keimreduktionstest (Count-Reduction-Test)	67
3.1.2.1 Sporenbildende Mikroorganismen 3.1.2.2 Vegetative Mikroorganismen 3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen 3.1.4 Sprühapparatur 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 3.1.6 Keimzahlbestimmung 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Areibungszahl	3.1.2 Verwendete Mikroorganismen	68
3.1.2.2 Vegetative Mikroorganismen 3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen 3.1.4 Sprühapparatur 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 3.1.6 Keimzahlbestimmung 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 J. Siegelnahtfestigkeit 3.4.2 J. Siegelnahtfestigkeit 3.4.2 J. Operflächenenergie	3.1.2.1 Sporenbildende Mikroorganismen	68
3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen 3.1.4 Sprühapparatur 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 3.1.6 Keimzahlbestimmung 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl	3.1.2.2 Vegetative Mikroorganismen	69
3.1.4 Sprühapparatur 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 3.1.6 Keimzahlbestimmung 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3 1 Eigene Experimente 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl	3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen	70
 3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation 3.1.6 Keimzahlbestimmung 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl 3.4 2 3 Oberflächenenergie 	3.1.4 Sprühapparatur	72
 3.1.6 Keimzahlbestimmung 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl 3.4.2 3 Oberflächenenergie 	3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation	74
 3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4 Verwendete Kunststoffe 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl 3.4 2 3 Oberflächenenergie 	3.1.6 Keimzahlbestimmung	75
 3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger 3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl 3.4 2 3 Oberflächenenergie 	3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse	77
3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung 3.1.8 Färbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit 3.4.2.3 Oberflächenenergie	3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger	77
3.1.8 Farbemethode nach Gram 3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3 Plasmabehandlung 3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2 Reibungszahl 3.4.3 Oberflächenengergie	3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung	/8
3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung 7 3.2.1 Plasmaanlage 7 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 8 3.2.3 Plasmabehandlung 8 3.2.3.1 Eigene Experimente 8 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 8 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 8 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 8 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 8 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 9 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 9 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 9 3.4.2 Neibungszahl 9 3.4.2 3 Oberflächenenergie 9	3.1.8 Farbemethode hach Gram	79
3.2.1 Plasmaanlage 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 8 3.2.3 Plasmabehandlung 8 3.2.3.1 Eigene Experimente 8 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 8 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 8 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 8 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 8 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 9 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 9 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 9 3.4.2 Reibungszahl 9 3.4.2 3 Oberflächenenergie 9	3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung	79
3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung 8 3.2.3 Plasmabehandlung 8 3.2.3 Plasmabehandlung 8 3.2.3.1 Eigene Experimente 8 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 8 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 8 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 8 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 8 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 9 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 9 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 9 3.4.2 Reibungszahl 9 3.4.2 3 Oberflächenenergie 9	3.2.1 Plasmaanlage	79
3.2.3 Plasmabehandlung 8 3.2.3.1 Eigene Experimente 8 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 8 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 8 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 8 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 8 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 9 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 9 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 9 3.4.2 Reibungszahl 9 3.4.3 Oberflächenenergie 9	3.2.2. Vorrichtung zur Gaskonditionierung	81
3.2.3.1 Eigene Experimente 3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 8 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 8 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 8 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 9 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 9 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 9 3.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit 9 3.4.2.3 Oberflächenenergie 9	3 2 3 Plasmabehandlung	83
3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT 3.3 3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden 8 3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System 8 3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden 8 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 8 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 9 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 9 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 9 3.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit 9 3.4.2.3 Oberflächenenergie 9	3.2.3.1 Eigene Experimente	83
3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden83.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System83.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden83.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen83.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik93.4.1 Verwendete Kunststoffe93.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften93.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit93.4.2.3 Oberflächenenergie9	3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT	83
3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System83.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden83.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen83.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik93.4.1 Verwendete Kunststoffe93.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften93.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit93.4.2.3 Oberflächenenergie9	3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden	85
3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden83.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen83.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik93.4.1 Verwendete Kunststoffe93.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften93.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit93.4.2.2 Reibungszahl93.4.2.3 Oberflächenenergie9	3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System	85
 3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen 3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 3.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit 3.4.2.2 Reibungszahl 3.4.2.3 Oberflächenenergie 	3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden	86
3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik 9 3.4.1 Verwendete Kunststoffe 9 3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften 9 3.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit 9 3.4.2.2 Reibungszahl 9 3.4.2.3 Oberflächenenergie 9	3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen	86
3.4.1 Verwendete Kunststoffe93.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften93.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit93.4.2.2 Reibungszahl93.4.2.3 Oberflächenenergie9	3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik	91
3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften93.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit93.4.2.2 Reibungszahl93.4.2.3 Oberflächenenergie9	3.4.1 Verwendete Kunststoffe	91
3.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit3.4.2.2 Reibungszahl3.4.2.3 Oberflächenenergie	3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften	91
3.4.2.2 Reibungszahl 3.4.2.3 Oberflächenenergie	3.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit	91
3 4 2 3 Obertlächenenggie	3.4.2.2 Reibungszahl	92
	3.4.2.3 Oberflächenenergie	92
3.4.2.4 Sauerstoffdurchlässigkeit	3.4.2.4 Sauerstoffdurchlässigkeit	93
5.4.2.5 Durchstoblesugken	5.4.2.5 Durenstoblestigken	94
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	96

4.1 Experimente zur mikrobiologischen Entkeimungseffizienz der KDBE	96
4.1.1 Einfluss des Prozessgases auf die Entkeimung	96
4.1.2 Analyse des Tailings	102
4.1.3 Mikrobiologische Entkeimungseffizienz der kaskadierten Barrierenentla	dung
(KDBE)	106
4.1.3.1 Entkeimungseffizienz bei vegetativen Bakterien	107

4.1.3.2 Entkeimungseffizienz bei bakteriellen Endosporen 4.1.3.3 Entkeimungseffizienz bei Konidiosporen von <i>A. niger</i>	109 112
 4.2 Experimente zur Optimierung der Entkeimungsleistung 4.2.1 Einfluss der Luftfeuchte auf die Inaktivierungseffizienz 4.2.1.1 Inaktivierungsverhalten von A. niger DSM 1957-Konidiosporen bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten 4.2.1.2 Inaktivierungsverhalten von <i>B. subtilis</i>-Endosporen bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten 4.2.2 Einfluss des Excimer-Strahlers auf die Entkeimungseffizienz 	117 117 118 124 127
 4.3 Experimente zu den Plasma-Wirkmechanismen 4.3.1 Wirkung auf die Sporenhülle respektive bakterielle Zellwand 4.3.2 Wirkung auf die DNS 4.3.2.1 Quantitativer Nachweis von DNS-Schäden 4.3.2.2 Qualitativer Nachweis von DNS-Schäden 	131 132 135 136 140
 4.4 Experimente zur Packstoffmodifikation 4.4.1 Siegelnahtfestigkeit 4.4.2 Reibungszahl 4.4.3 Oberflächenenergie 4.4.4 Sauerstoffdurchlässigkeit 4.4.5 Durchstoßfestigkeit 	144 145 146 147 148 150
4.5 Folgerungen zur industriellen Umsetzbarkeit	152
5 ZUSAMMENFASSUNG	157
5.1 Zusammenfassung der mikrobiologischen Ergebnisse	157
5.2 Zusammenfassung zu den Plasma-Wirkmechanismen	160
5.3 Zusammenfassung der Packstoffanalysen	162
5.4 Zusammenfassung zur industriellen Umsetzbarkeit	163
6 LITERATURVERZEICHNIS	166
6.1 Fachliteratur	166
6.2 Eigene Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge zur Plasmaentkeimut	^{ng} 175
6.3 Internetquellen	176

7 ANHANG	177
7.1 Rezepturen von Nährlösungen und Nährböden	177
7.2 Rezepturen von Pufferlösungen	178
7.3 Tabellen	179

Symbolverzeichnis

Lateinische Formelzeichen

Wasseraktivität	-
Anpassungsfaktor für die Weibullverteilung	-
Faktor der niedrigsten Verdünnung	-
Dezimale Reduktionszeit	s, min
Energie	J
Kraft	Ν
Stromstärke	А
Geschwindigkeitskonstante	s ⁻¹
Parameter des sigmoiden Modells	-
Masse	g
Parameter des sigmoiden Modells	-
Stoffmenge	mol
Atom/Molekül zur Aufnahme der Überschussenergie	-
Parameter für die Weibullverteilung	-
Teilchenzahldichte	m ⁻³
Konzentration an Mikroorganismen	KbE/Einheit
Anzahl an Teilchen	Stückzahl
Druck	Pa
Leistung	W
Gaskonstante	J/kg·K
Überlebensrate	-
zonenabhängiger Faktor des Spiralplaters	-
Zeit	s, min
absolute Temperatur	Κ
Frequenz des Energietransfers	s^{-1}, min^{-1}
Massenverhältnis	-
Reaktionsgeschwindigkeit	m/s
Volumen	ml
	Wasseraktivität Anpassungsfaktor für die Weibullverteilung Faktor der niedrigsten Verdünnung Dezimale Reduktionszeit Energie Kraft Stromstärke Geschwindigkeitskonstante Parameter des sigmoiden Modells Masse Parameter des sigmoiden Modells Stoffmenge Atom/Molekül zur Aufnahme der Überschussenergie Parameter für die Weibullverteilung Teilchenzahldichte Konzentration an Mikroorganismen Anzahl an Teilchen Druck Leistung Gaskonstante Überlebensrate zonenabhängiger Faktor des Spiralplaters Zeit absolute Temperatur Frequenz des Energietransfers Massenverhältnis Reaktionsgeschwindigkeit

x Entladungsstrecke

Indizes

Anfang, Beginn 0 a Atom Argon Ar В Boltzmann Elektron e Е Energie G gesamt i Ion kinetische k Luft L М Molekül PE Plasmaeinheit Sterilisationszeit, Spiralpalter S SL synthetische Luft Zeitpunkt t t U untersuchtes Volumen

Griechische Formelzeichen

α	1. Townsendscher Ionisierungskoeffizient	m^{-1}
γ	2. Townsendscher Ionisierungskoeffizient	-
σ	Wirkungsquerschnitt, Kollisionsquerschnitt	m ²
λ	mittlere freie Weglänge	m
θ	Temperatur	Κ
ν	Frequenz, Takt, Häufigkeit des Energietransfers	s ⁻¹ , min ⁻¹
μ	Gleitreibungszahl	-

Konstanten

eV	$= 1,602 \cdot 10^{-19} $ J	Elektronenvolt
h	$= 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J/s}$	Plancksches Wirkungsquantum
$k_{\rm B}$	$= 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$	Boltzmann-Konstante
me	$= 9,109 \text{ x } 10^{-31} \text{ kg}$	Masse eines Elektrons

Operatoren

d	Differential
Δ	Differenz
ln	natürlicher Logarithmus
lg, log	dekadischer Logarithmus

Mikroorganismengattungen

A	Aspergillus
11	Isperguius

- B Bacillus
- Cl Clostridium
- D Deinococcus
- E Escherichia
- G Geobacillus
- Salm Salmonella
- Staph Staphylococcus

Abkürzungen

Al	Aluminium

ATP	Adenosintriphosphat
-----	---------------------

Bp Basenpaare

СХ	Cortex (Sporenrinde)			
DBE	Dielektrische Barrierenentladung			
DNS	Desoxyribonukleinsäure			
DPG	Deutsche Physikalische Gesellschaft			
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen,			
	Braunschweig			
EX	Exosporium			
ES	Endosporen			
FDA	Food and Drug Administration			
HF	Hochfrequenz			
IC	inner coat – innere Sporenhülle			
ICP	inductive coupled plasma			
IM	inner membrane – innere Membran			
ССР	capacitive coupled plasma			
PE-HD	high density PE			
KD	Konidiosporen			
KDBE	Kaskadierte dielektrische Barrierenentladung			
KbE	Koloniebildende Einheiten			
PE-LD	low density PE			
PE-LLD	low linear PE			
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration			
NFPA	National Food Processors Association			
OC	outer coat – äußere Sporenhülle			
OKZ	Oberflächenkeimzahl			
OM	outer membrane – äußere Sporenmembran			
PAGE	Polyacyrlamid-Gelelektrophorese			
PCW	primordial cell wall – ursprüngliche Zellwand			
PCR	Polymerase chain reaction			
PE	Polyethylen			
PEN	Polynaphthen			
PET	Polyethylenterephthalat			
РР	Polypropylen			
PS	Polystyrol			

PVC	Polyvinylchlorid
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNS	Ribonukleinsäure
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale- Ribonukleinsäure
tRNS	transfer- Ribonukleinsäure
SASP	small acid soluble proteins (kleine säurelösliche Proteine)
UV	Ultraviolett
VF	Verdünnungsfaktor
VUV	Vakuum-Ultraviolett
vZ	vegetative Zellen

1 Einleitung

1.1 Packstoffentkeimung in der Lebensmittelindustrie

Die Verpackung hat in der Nahrungs- und Genussmittelindustrie einen hohen mikrobiologische Stellenwert. da sie chemische, physikalische und Wechselwirkungen zwischen Umwelt und Füllgut unterbinden und auf diese Weise einen hohen Qualitäts- und Sicherheitsstandard über eine längere Zeitspanne gewährleisten soll. Für eine ausreichende mikrobiologische Stabilität des abgepackten Lebensmittels wird neben der Behandlung des eigentlichen Produktes (z.B. die Pasteurisation oder UHT-Erhitzung bei Milch) auch die Verpackung bzw. der Packstoff vor dem Befüllen einem Entkeimungsprozess unterzogen. Ziel einer Packstoffentkeimung ist die zuverlässige Abtötung von pathogenen Mikroorganismen und Lebensmittelverderbern. Nur so kann eine hohe Produktqualität über einen langen Zeitraum und die Sicherheit des Konsumenten gewährleistet werden. Der Anspruch an eine leistungsfähige Packstoffentkeimung steigt aufgrund neuer Entwicklungen und Trends im Lebensmittel- und Verpackungssektor: haltbare Getränke im neutralen pH-Bereich, neu entwickelte Verpackungen mit komplexen Geometrien und aus neuartigen Materialien, ebenso wie Forderungen des Handels nach verlängerten Haltbarkeiten. Maßgebend für die Anforderungen bezüglich der notwendigen Keimreduktion bei Packstoffen sind dabei unterschiedliche Kriterien: intrinsische Produkteigenschaften wie der pH-Wert oder die Wasseraktivität (aw-Wert), die Produktvorbehandlung, die angestrebte Haltbarkeit (z.B. Frischmilch oder H-Milch), aber auch der Vertriebsweg (z.B. Kühlkette). In der Lebensmittelindustrie existieren mittlerweile unterschiedliche Maschinenkonzepte für die Realisierung keimarmer oder aseptischer Abfüllprozesse, wobei das Leistungsspektrum aus Bezeichnungen wie "Ultra-Clean" oder "Halb-Aseptik" nicht immer klar hervorgeht. Eine Kategorisierung für hygienische Abfüllanlagen und deren typische Anwendungsfelder wurde vom Verband deutscher Maschinen- und Anlagenbauer (VDMA) herausgegeben [VDMA, 2000].

Allgemein kann bei der Packstoffentkeimung zwischen zwei Verfahrensansätzen unterschieden werden: der Teilentkeimung zum einen und einer vollständigen Sterilisation im Rahmen der sog aseptischen Abfüllung zum anderen. Bei der Teilentkeimung erfolgt nur eine partielle Reduktion der mikrobiologischen Belastung auf dem Packstoff, woraus eine verlängerte Haltbarkeit und ein verbesserter Hygienestatus der abgefüllten Produkte resultieren. In diesem Bereich gibt es keine klar definierten Anforderungen bezüglich der Testkeime und Reduktionsraten. Zum Einsatz kommen diverse physikalische Verfahren wie Bestrahlung (z.B. UV-Strahlung) oder Heißluft, aber auch chemische Methoden basierend auf Peressigsäure und Wasserstoffperoxid. Alle Verfahren finden auch in Kombination Anwendung. Die Teilentkeimung wird oft bei sauren Produkten mit pH-Werten unter 4,5 eingesetzt, bei denen ein Auskeimen mikrobieller Sporen nicht mehr erwartet wird sowie bei Lebensmitteln mit begrenzter Haltbarkeit und Erzeugnissen, die in der Kühlkette vertrieben werden.

Eine Sterilisation von Packstoffen hingegen führt definitionsgemäß zu einer Oberfläche. die frei von allen lebensfähigen Mikroorganismen ist widerstandsfähige Endosporen eingeschlossen. Dies bildet die Grundlage der Aseptik, bei der sterile Produkte rekontaminationsfrei in sterile Packmittel abgefüllt werden. Sterile Einheiten können dabei nur entstehen, wenn neben Packstoff und Füllgut auch die produktführenden Maschinen- und Anlagenteile sowie der Abfüllbereich keimfrei und nach außen hin abgeschirmt sind. Die Notwendigkeit aseptischer Prozesse ist dann gegeben, wenn Nahrungsmittel mit hohem aw-Wert und einem pH-Wert über 4,5 ohne Kühlung für mehrere Monate haltbar sein sollen. Ein Beispiel dafür ist H-Milch.

Um die mikrobiologische Sicherheit auch bei kritischen Produkten zu gewährleisten, werden bei der Aseptik hohe Anforderungen an die Entkeimungsanlage, den Maschineninnenraum (Isolator, Steriltunnel) sowie produktführende Anlagenteile gestellt. In der europäischen Union existieren noch keine gesetzlichen Regelungen über die Mindestanforderungen an aseptisch arbeitende Verpackungsmaschinen, doch liegen Empfehlungen von Fachverbänden wie dem VDMA vor [WILKE, 1996]. Demnach müssen Aseptikanlagen Mikroorganismen einschließlich Sporen zuverlässig abtöten. Als Nachweis wird dabei die Keimreduktion eines geeigneten Testkeims von mindestens vier Zehnerpotenzen bei Maschineninnenraum und Packstoff bzw. von fünf Zehnerpotenzen am Füller gefordert [VDMA, 2006]. Trotz der vergleichsweise hohen Kosten und den mikrobiologischen Anforderungen an die Entkeimungsvorrichtung und das Prozessumfeld, erlangen aseptische Abfüllprozesse immer mehr an Bedeutung, da sie eine kontinuierliche sowie qualitätsschonende Verarbeitung zulassen und den ernährungsphysiologischen Wert von Lebensmitteln erhalten. Allein in den USA wurden 2004 etwa 4,61 Mrd. Dollar Umsatz im Marktsegment der aseptischen Verpackung erzielt [FROST & SULLIVAN, 2005]. Im Gegensatz dazu sind Verfahren wie die Heißabfüllung und die nachträgliche Erhitzung abgefüllter Produkte in der Verpackung häufig nicht ökonomisch (hoher Energieverbrauch) oder mit unerwünschten Qualitätseinbußen (etwa Aromaverlust) verbunden. Sie eignen sich auch nur für temperaturunempfindliche Materialien wie Metall oder Glas. Zudem drängt der ständig steigende Marktanteil an polymeren Verpackungen (z.B. PET-Flaschen) die klassischen thermischen Verfahren immer mehr in den Hintergrund, da Kunststoffe wie das Polyethylenterephthalat (PET) thermolabil sind.

Ein zweckmäßiges Sterilisationsverfahren für Packstoffe sollte einige wichtige Kriterien erfüllen. Dazu zählen eine schnelle und zuverlässige mikrobizide Wirkung, Kompatibilität mit dem Packstoff, Rückstandsfreiheit, gesundheitliche Unbedenklichkeit für Verbraucher und Personal sowie Wirtschaftlichkeit [ANSARI & DATTA, 2003].

Für die Sterilisation von Packstoffen in der Lebensmittelindustrie werden derzeit Verfahren eingesetzt, die auf Sattdampf (130-150°C) bzw. trockener Hitze (> 180°C), Peressigsäure oder Wasserstoffperoxid basieren, wobei Letzteres die gängigste Sterilisationsmethode darstellt [KESSLER, 1996]. Grundlage bei allen genannten Behandlungsweisen ist eine thermische Energiezufuhr, die bei Sattdampf bzw. trockener Hitze ausschließlich und bei den chemischen Verfahren mit Wasserstoffperoxid und Peressigsäure maßgeblich an der schnellen Entkeimungswirkung beteiligt ist. Wasserstoffperoxid und Peressigsäure setzen unter Erhitzen reaktiven atomaren Sauerstoff frei, der Mikroorganismen angreift und nachhaltig schädigen kann. Die typischen Temperaturen bei Gebrauch von z.B. Wasserstoffperoxid liegen in einem Bereich von 65-80°C [CERNY, 1988]. Der vermehrte Einsatz thermolabiler Kunststoffe als Packstoff erfordert allerdings moderate Prozesstemperaturen, da beispielsweise Polyethylenterephthalat (PET) bereits in einem Bereich von 70-80°C zu schrumpfen beginnt. Eine Absenkung der Temperatur führt zu einer Verminderung des Wirkungsgrades der genannten Sterilisationsmethoden, die lediglich durch eine Verlängerung der Behandlungsdauer

kompensiert werden kann. Dies wirkt sich negativ auf den Durchsatz und somit auf die Wirtschaftlichkeit aus. Neben der Temperatur spielen bei den chemischen Verfahren auch Aspekte wie Handling, Einhaltung der maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK-Werte) oder Rückstandsproblematik eine wesentliche Rolle. Die genannten Argumente stellen eine Auswahl der Gründe dar, warum eine neue Methode für die Entkeimung bzw. die Sterilisation von Packstoffen wünschenswert ist.

Als Alternative für die Entkeimung von thermolabilen Packstoffen bietet sich die Plasmatechnologie an.

1.2 Kenntnisstand zur Plasmaentkeimung

Gasplasmen werden bereits seit geraumer Zeit industriell für die Behandlung und Modifikation von diversen Werkstoffen genutzt. Dabei reicht das Wirkungsspektrum von der Feinstreinigung über die Oberflächenaktivierung, bis hin zur Plasmabeschichtung und dem Plasmaätzen. Die Anwendung der Plasmatechnologie für die Packstoffentkeimung im Lebensmittel- und Medizinbereich setzt in der Regel materialschonende Behandlungsparameter voraus und ist erst seit wenigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung.

Generell lassen sich zwei verschiedene Arten der Plasmabehandlung unterscheiden: Die Anwendung im direkten Plasma zum einen und der Einsatz von sog. Remote-Prozessen (Afterglow-Plasmen, indirektes Plasma) zum anderen. Bei den Remote-Prozessen befinden sich die Substrate außerhalb des Anregungsbereiches des Plasmas. Die dominierenden Spezies sind im diesen Fall angeregte Neutralteilchen, wodurch eine gemäßigte Behandlung der Substrate erzielt wird.

1.2.1 Remote-Plasmaprozesse

HURY et al. [1998] experimentierten zum Zwecke der Abtötung von *Bacillus*-Sporen mit sauerstoffbasierten Plasmen im Niederdruck (ca. 0,5 Pa). Die Erzeugung des Plasmas erfolgte in einem zylindrischen Reaktor (d = 300 mm, h = 300 mm) durch

Einkopplung von Mikrowellen (2,45 GHz) mit einer Leistung von 600 W. Als Versuchsvariablen wurden verschiedene Gase (Ar, O₂, CO₂) und Aerosole (H₂O₂, H₂O), Bacillus-Spezies (B. subtilis, B. pumilus, B. cereus, B. stearothermophilus) unterschiedlicher Keimdichte und ein möglicher Temperatureinfluss (-15°C, 15°C, 60°C) untersucht. Dabei zeigte sich im Sauerstoffplasma der Testkeim B. subtilis als besonders resistent, im Gegensatz zu B. stearothermophilus. Bei der Variation der Gase erwies sich das CO₂-Plasma mit einer Abtötungsrate von etwa 3,5 Zehnerpotenzen für B. subtilis-Sporen in 120 Minuten als sehr effizient (Ausgangskeimzahl 10⁷ KbE/Objekt, Temperatur 15°C). Des Weiteren konnte bei zunehmender Inokulationsdichte, d.h. einer Verringerung der beimpften Fläche bei konstanter Keimzahl, eine Verschlechterung der Entkeimung beobachtet werden, was auf Zellanhäufungen zurückgeführt wurde. Die Analyse des Temperatureinflusses ergab eine signifikante Leistungssteigerung bei 60°C. In diesem Fall konnte mit einem CO2-Plasma die Anfangskeimzahl an B. subtilis-Sporen innerhalb von 30 Minuten um sechs Zehnerpotenzen reduziert werden, im Vergleich zu etwa drei Zehnerpotenzen bei –15°C. Die geringste Abtötung wurde bei 15°C erzielt [HURY et al., 1998].

Im Jahre 2001 führten PUREVDORJ et al. Studien zur Abtötung diverser *Bacillus*-Sporen mit einem Niedertemperatur-Argon-Plasma bei variierender Leistungsdichte durch (1,47; 2,63; 4,21 W/cm³). Dabei wurde das Plasma in einem Reaktor (d = 250 mm, h = 220 mm) mit Argon bei einem Gasdruck von 50 Pa unter Einkopplung von Mikrowellen (2,45 GHz) unterschiedlicher Leistung (ca. 70, 125, 200 W) erzeugt und in eine Sterilisationskammer überführt. Durchgeführte Messungen im Argonplasma ergaben eine Temperaturverteilung im Bereich von 31°C bis maximal 43°C, in Abhängigkeit der applizierten Leistung. Die Abtötungskinetiken zeigten Resistenzunterschiede zwischen den getesteten *Bacillus*-Spezies: Innerhalb von 60 Minuten konnten bei der höchsten Leitungsdichte (4,21 W/cm³) nur etwa 0,5 Zehnerpotenzen von *Bacillus subtilis* Sporen abgetötet werden, aber annähernd zwei Zehnerpotenzen bei *Bacillus stearothermophilus* [PUREVDORJ et al., 2001].

2002 veröffentlichten PUREVDORJ et al. weitere Ergebnisse zur Plasmaentkeimung mit dem Mikrowellenreaktor und Argon als Prozessgas. Schwerpunkte dieser Arbeit

waren sowohl die mikrobizide Wirkung des Plasmas auf den Testkeim *Escherichia coli* in Abhängigkeit zur eingekoppelten Leistung als auch eine Bewertung der räumlichen Entkeimungswirkung bei unterschiedlichen Positionen im Reaktor. Die mikrobiologischen Versuche zeigten eine zunehmende Abtötung (4,5; 5,2; 6,3; Zehnerpotenzen) der Zellen bei steigender Leistungsdichte (1,5; 2,6; 4,2 W/cm³) und einer konstanten Behandlungsdauer von 30 Minuten. Bei der Betrachtung unterschiedlicher Positionen auf dem Probenhalter wurde die beste Wirkung in der Mitte erzielt, wo die Probe dem direkten Plasma ausgesetzt war [PUREVDORJ et al., 2002].

MOISAN et al. [2002] publizierten einen Beitrag zu den Methoden und Mechanismen der Plasmaentkeimung im Niederdruck mit einem N₂/O₂-Gasgemisch. Dabei charakterisierten sie einen zwei- bzw. dreiphasigen Verlauf der Abtötungskurven. Kinetiken also, die in erster Näherung einer Reaktion erster Ordnung entsprechen, aber abschnittsweise unterschiedliche Steigungen und Zeitkonstanten aufweisen. Nach MOISAN et al. [2002] beruhen die unterschiedlichen Abtötungsgeschwindigkeiten auf der limitierten Eindringtiefe der kurzwelligen Strahlung infolge der Bildung von Zellschichten (z.B. Agglomerate), die einen Abtrag der Zellsubstanz durch z.B. Radikalchemie oder Photodesorption notwendig macht. Als grundlegender Wirkmechanismus wurde der folgende dreistufige Elementarprozess vorgeschlagen: Schädigung des zellulären genetischen Materials (DNS) durch UV-Strahlung (1. Phase), langsamere Erosion der Mikroorganismenstruktur durch UVinduzierte Photodesorption und Radikalchemie (Phase 2) sowie wiederholte UV-Wirkung auf freigelegte Zellen (Phase 3). Essentiell ist dabei die synergistische Wirkung der einzelnen Mechanismen Strahlung und Radikalchemie [MOISAN et al., 2002].

1.2.2 Direkte Plasmaprozesse

Eine Bewertung der Wirkmechanismen eines Niedertemperaturplasmas bei Atmosphärendruck, erzeugt in einer Barrierenentladung mit Luft als Prozessgas, erfolgte durch LAROUSSI & LEIPOLD [2004]. Basierend auf optischer Diagnostik und

Gasdetektionsmessungen wurden die reaktiven Spezies wie atomarer Sauerstoff (O), Hydroxylradikale (OH·) und Stickoxide (NO) als wesentliche Faktoren bei der Inaktivierung der Mikroorganismen bestimmt. Der Beitrag der UV-Strahlung und der Hitze wurde wegen der minimalen bzw. indirekten Wirkung als sekundär eingestuft [LAROUSSI et al., 2004].

MOREIRA et al. zeigten 2004, dass bei Verwendung eines Niederdruckplasmas (ca. 44 Pa) und Sauerstoff als Prozessgas eine Inaktivierung von *Bacillus stearothermophilus*-Endosporen um sieben Zehnerpotenzen innerhalb von sieben Minuten möglich ist. Dabei wurden Teststreifen aus Cellulose ($50 \times 5 \text{ mm}^2$) mit einer initialen Keimzahl von etwa 10^6 Sporen dem Plasma direkt ausgesetzt. Durchgeführte REM-Aufnahmen zeigten massive Zerstörungen und Deformationen der Sporen [MOREIRA et al., 2004].

LEI et al. führten 2004 Experimente mit einer Barrierenentladung und Luft als Prozessgas durch. Dabei konnte bei Raumtemperatur und nach zwei Minuten Behandlungszeit kein Wachstum der Testkeime (*Escherichia coli*) beobachtet werden. Als Prozessparameter wurden eine sinusförmige Hochspannung von etwa 40 kV mit einer Frequenz im Bereich von 1-20 kHz gewählt - bezüglich der Ausgangskeimzahl und applizierten Leistung wurden keine Angaben gemacht. Die mikrobizide Wirkung dieses Plasmas wurde im Wesentlichen auf die Entstehung starker Oxidantien wie Ozon (O₃) und atomarer Sauerstoff (O) zurückgeführt, und deren schädigende Wirkung auf zelluläre Komponenten (z.B. Enzyme, Zellmembran) [LEI et al., 2004].

Die aufgeführten Publikationen stellen lediglich eine Auswahl dar und sollen einen kurzen Überblick über die Forschungsarbeiten sowie die Entwicklungen der Plasmaentkeimung in den letzten Jahren geben.

1.3 Ziel und Inhalt der Arbeit

Die Anwendung eines Niedertemperaturplasmas bei Atmosphärendruck für die Entkeimung von Flachfolien, die für die Lebensmittelverpackung relevant sind, soll untersucht und bewertet werden. Bei dem verwendeten System handelt es sich um eine spezielle Variante der Barrierenentladung, der sog. kaskadierten dielektrischen Barrierenentladung (KDBE), die am Fraunhofer Institut für Lasertechnik (ILT) konzipiert und entwickelt wurde. Das patentierte Prinzip beruht auf einer Kombination aus direktem Plasma und einem Excimer-Strahler.

Im Hinblick auf einen späteren industriellen Praxiseinsatz ist das Ziel, eine schnelle und effiziente Entkeimung von polymeren Oberflächen unter Beibehaltung der wesentlichen Packstoffeigenschaften zu erreichen. Aufgrund angestrebter Kapazitätssteigerungen bei Abfüllanlagen ist es für industrielle Anwendungen erforderlich, dass die Behandlungszeiten für die Packstoffentkeimung möglichst kurz sind (< 10 s). Nur so kann eine wirtschaftliche Produktion gewährleistet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss ausgewählter Faktoren auf die Inaktivierung von Mikroorganismen mit der KDBE analysiert. Zunächst werden die Wirkung verschiedener Prozessgase (Luft, Sauerstoff, Stickstoff und Argon) auf die mikrobiziden Plasmaeigenschaften und die damit verbundene Entkeimungsleistung bei ausgewählten Testkeimen betrachtet. Mit den empirisch ermittelten Parametern zur Erzeugung eines biologisch wirksamen Plasmas werden eine Vielzahl lebensmittelrelevanter Mikroorganismen behandelt und die praktische Entkeimungseffizienz anhand von Inaktivierungskinetiken belegt. Dies ermöglicht eine Aussage über das mikrobizide Wirkungsspektrum und eine Einschätzung der Praxistauglichkeit der kaskadierten Barrierenentladung. Durch Variation der relativen Luftfeuchte und der Wellenlänge des Excimer-Strahlers sollen zwei Aspekte zur Optimierung geprüft werden. Neben den Untersuchungen zur mikrobiologischen Wirksamkeit grundlegenden sollen auch mögliche Packstoffmodifikationen sowie zelluläre Veränderungen analysiert und bewertet werden

Grundlage bei den Studien zu den Wirkmechanismen ist die Betrachtung einzelner Zellbestandteile (wie Zellwand oder Erbgut (DNS)) und deren Veränderung infolge einer Plasmabehandlung. Dies soll Rückschlüsse auf die primären Wirkkomponenten der kaskadierten Barrierenentladung erlauben und Grundlage für weitere Optimierungsschritte sein.

Für die Bewertung der industriellen Anwendbarkeit dieses Systems zur Entkeimung von Polymerfolien sollen Analysen bezüglich möglicher Auswirkungen der Plasmabehandlung auf die Packstoffeigenschaften einbezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden an lebensmittelrelevanten Kunststoffen die folgenden Faktoren überprüft: Siegelnahtfestigkeit, Gasdurchlässigkeit, Reibungszahl, Oberflächenenergie und Durchstoßfestigkeit.

Auch Überlegungen zur Realisierbarkeit in der Lebensmittelindustrie sind erforderlich. Auf Grundlage der durchgeführten Experimente sollen optimale Einstellungen für die Entkeimung ermittelt und geeignete Testkeime für die Validierung dieses Systems empfohlen werden. Die Betrachtung der Behandlungszeiten und der Kosten soll helfen, eine erste Einschätzung über die Anwendbarkeit und Wirtschaftlichkeit der kaskadierten Entladung zu treffen.

2 Stand des Wissens

2.1 Mikrobiologische Grundlagen

Für eine Bewertung der Leistungsfähigkeit einer Entkeimungsvorrichtung und deren Optimierung ist es erforderlich, die Effizienz der mikrobiologischen Abtötung in Abhängigkeit der Zeit zu bestimmen und den Einfluss relevanter Zustandsgrößen (z.B. Temperatur) auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu prüfen. Dies geschieht durch Anfertigung von Inaktivierungskinetiken und Ermittlung der keim- und verfahrensspezifischen D-Werte. Durch Abgleich der empirisch ermittelten Daten mit den jeweiligen Anforderungen an die Entkeimungsvorrichtung (z.B. im Lebensmittelbereich für Packstoffe) kann eine Aussage über die Zweckmäßigkeit des Verfahrens generell bzw. entsprechender Parameter-Sätze getroffen werden.

2.1.1 Reaktionskinetik der mikrobiologischen Inaktivierung

Da die Abtötung einer Mikroorganismenpopulation normalerweise exponentiell erfolgt, d.h. dass die Ausgangskeimzahl pro Zeiteinheit immer um einen gleich bleibenden Prozentsatz sinkt, lässt sich dieser Prozess formalkinetisch recht gut mit einer Reaktion erster Ordnung beschreiben [KRÄMER, 2002]. Die Überlegung gründet auf einer Analogie zwischen mikrobieller Inaktivierung und chemischen Reaktionen und ist ein klassisches Konzept der Lebensmitteltechnologie bei der Herstellung steriler Produkte [PARDEY et al., 2005a]. Die nachfolgenden Gesetzmäßigkeiten sind auf die Entkeimung von Oberflächen (Packstoffen) übertragbar.

$$- dN / dt = k_1 N_t$$

$$- dN / dt = v$$
(Gl. 1)

Der zeitliche Ablauf einer Reaktion, in diesem Fall der Inaktivierung von Mikroorganismen, wird durch die Reaktionsgeschwindigkeit v beschrieben und ist gleich der Konzentrationsänderung dN in der Zeit dt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von Prozessparametern wie der Ausgangskonzentration an Zellen, der Art bzw. Intensität des Letalfaktors (z.B. Temperatur) und natürlich der Zeit abhängig. Diese Einflussgrößen werden durch die Geschwindigkeitskonstante k berücksichtigt [ENGELHARD, 2005; KESSLER, 1996; KULOZIK, 2006].

Durch Integration der oben gezeigten Gleichung (1) über ein endliches Integral von t=0 bis t erhält man die Konzentrationsänderung von der Ausgangskonzentration N_0 auf die Endkonzentration N_t während der Reaktionszeit t.

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -k_1 t \tag{G1. 2}$$

Bei der Entkeimung entspricht die Reaktionszeit der Behandlungsdauer mit dem entkeimenden Agens und die Konzentrationen werden als Koloniebildende Einheiten (KbE) pro Maßeinheit (ME) angegeben. Je nach Entkeimungszweck (Lebensmittel, Oberflächen etc.) kann es sich dabei um eine volumen- oder flächenbezogene Einheit handeln (ml, g, cm² etc.). Aus praktischen Gründen ist es zweckmäßig den dekadischen Logarithmus zu verwenden:

$$\lg \frac{N_t}{N_0} = -\frac{k_1}{2,303}t$$
 (Gl. 3)

Für die graphische Darstellung der Inaktivierung von Mikroorganismen wird die Keimzahl logarithmisch über der Reaktionszeit bzw. der Behandlungsdauer aufgetragen (halblogarithmischer Maßstab).



Abbildung 1: Logarithmische Darstellung der Keimzahl über der Behandlungsdauer t bei unterschiedlichen Temperaturen (91, 92). Der D-Wert entspricht der erforderlichen Zeit für eine Keimreduktion um eine Zehnerpotenz bei letalen Bedingungen [KESSLER, 1996].

$$\lg N_{t} = -\frac{k_{1}}{2,303}t + \lg N_{0}$$
(Gl. 4)

Daraus ergibt sich eine Gerade mit der negativen Steigung $k_1/2,303$ und einem Schnittpunkt bei N₀, der sog. mikrobiologischen Ausgangsbelastung. Die erforderliche Zeit für eine vollständige Abtötung aller Zellen, d.h. eine Sterilisation, ergibt sich aus der Annahme, dass die vorliegende Keimzahl N_t zum Zeitpunkt t kleiner als 1 ist. Für eine annähernde Bestimmung wird N_t=1=10⁰ in die Gleichung (4) eingesetzt:

$$t_{N=1} = \frac{2,303}{k_1} \lg N_0 \tag{Gl. 5}$$

Für die Bestimmung der realen Sterilisationszeit t_s gilt: $t_s > t_{N=1}$. Die Gleichung (5) verdeutlicht, dass die Sterilisationszeit proportional zum Logarithmus der Ausgangskeimzahl N₀ ist. Daraus lässt sich folgern, dass der sterile Zustand umso

schneller erreicht wird, je geringer die mikrobielle Ausgangsbelastung ist [REUTER, 1986].

Entsprechend der Steigung der Geraden lässt sich die Zeit ermitteln, die erforderlich ist, um die Keimzahl auf 1/10 zu reduzieren bzw. 90% der Zellen abzutöten. Diese Zeitdifferenz wird als D-Wert oder dezimale Reduktionszeit bezeichnet und stellt eine parameterabhängige Größe dar. Für die Berechnung des D-Wertes bei festgelegten Bedingungen wie konstanter Temperatur \Box gilt: N₀/N_t = 10 [KESSLER, 1996, KULOZIK, 2006].

$$D_{\mathfrak{H}} = \Delta t_{1/10} = \lg \frac{N_0}{N_t} = \lg 10 = 1 = \frac{2,303}{k_1}$$
 (Gl. 6)

Durch Einsetzen in Gleichung (4) ergibt sich für die Keiminaktivierung folgender Zusammenhang [KESSLER, 1996, KULOZIK, 2006]:

$$\lg \frac{N_0}{N_t} = \frac{t}{D_{\vartheta}}$$
(Gl. 7)

D-Werte sind bei thermischen Verfahren (Pasteurisation, Sterilisation) temperaturabhängige Größen und geben nicht nur Aufschluss über die Effizienz der Entkeimung, sondern erlauben im Umkehrschluss auch eine Aussage über die Resistenz des verwendeten Testkeims gegenüber spezifischer Hitzeeinwirkung. Mit steigender Hitzeresistenz des Mikroorganismus nimmt auch der D-Wert bei einer konstanten Temperatur zu. Die Erhöhung der Prozesstemperatur führt hingegen zu einer Abnahme des D-Wertes. In der Lebensmittelindustrie dienen die D-Werte als Grundlage für die Berechnung der erforderlichen Behandlungszeiten bei konstant letalen Bedingungen, wie beispielsweise beim 12-D-Konzept in der Konservenindustrie. Dieses Konzept definiert die erforderliche Zeit, um die vorhandenen Keime des pathogenen Mikroorganismus Clostridium botulinum um 12 Zehnerpotenzen zu inaktivieren. Neben den thermischen Verfahren lässt sich durch die Bestimmung des D-Wertes auch eine Bewertung der Letalfaktoren anderer Entkeimungsmethoden und des Einflusses von Prozessparametern vornehmen. Im Fall der Plasmaentkeimung lassen sich D-Werte auch für verschiedene Leistungen oder Prozessgase ermitteln.

Je nach verwendetem Testkeim können bei den gleichen Entkeimungsparametern die D-Werte sehr stark variieren. So sind bakterielle Endosporen in der Regel viel widerstandsfähiger gegenüber Erhitzung ($D_{121^{\circ}C} = 408$ s für *G. stearothermophilus* in Phosphatpuffer) als Keime in der vegetativen Zustandsform ($D_{65^{\circ}C} \le 35$ s für die vegetativen Bakterien in Milch) [KESSLER, 1996]. Neben der Wirktemperatur haben auch die Applizierungsmethode und das Übertragungsmedium einen Einfluss. Feucht-thermische Behandlung mit Dampf führt zu einer schnelleren Inaktivierung als trockene Hitze bei gleicher Temperatur.

Weitere Faktoren, die die Resistenz und damit den D-Wert beeinflussen können, sind neben der genetisch bedingten Disposition verschiedener Keime (Genotyp) die Anzuchtbedingungen, die den Phänotyp des jeweiligen Mikroorganismus bestimmen. Wissenschaftliche Arbeiten haben gezeigt, dass Stresssituationen durch suboptimale Inkubationsbedingungen (betreffend Temperatur, pH-Wert oder Nährstoffangebot) die Eigenschaften und die Resistenz eines bakteriellen Stammes signifikant verändern können [NICHOLSON et al., 2000; IGURA et al., 2003; MELLY et al., 2002; CERF, 1977]. Darüber hinaus werden Schockfaktoren aber auch gezielt eingesetzt, zum Beispiel das Inaktivierungsverhalten von Mikroorganismen in um Lebensmitteln zu beeinflussen. Dies geschieht durch definierte thermische Vorbehandlung (Hitzeschock), welche zu einer gesteigerten Hitzeresistenz führt. Für die Lebensmittelpraxis bedeutet das aber auch, dass z.B. Verfahren mit langen Aufheizzeiten die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen möglicherweise auf erhöhen. Die meisten bekannten Einflussfaktoren das mikrobielle Resistenzverhalten resultieren aus Untersuchungen bei thermischen Verfahren und haben auch für andere Entkeimungsmethoden ihre Gültigkeit.

Häufig treten auch Abweichungen von der Reaktionsordnung bzw. Linearität der Inaktivierungskinetik auf, die sich meistens als ein Abflachen der Abtötungskurve oder diverser Schulterformen äußern (Abb. 2). Die Ursachen für diese Phänomene können vielfältig sein. Der englische Begriff "tailing" beschreibt das Abflachen der Abtötungskurve bei fortgeschrittenen Behandlungszeiten und wird häufig auf unterschiedliche Resistenzen innerhalb einer Mikroorganismenpopulation, auf Mischungen von Keimen bzw. Sporen mit verschiedenen D-Werten oder auf vorhandene Zellagglomerate zurückgeführt. Schulterformen im Verlauf der Kinetik entsprechen scheinbaren Verzögerungen in der Abtötung und lassen sich durch eine Aktivierung ruhender Sporen oder durch eine notwendige Vorschädigung begründen [KESSLER, 1996; PARDEY et al., 2005b; KULOZIK, 2006].



Abbildung 2: Reale Abweichungen im Kurvenverlauf einer Reaktion erster Ordnung [PARDEY et al., 2005a].

Weitere Gründe für nicht lineare Inaktivierungskurven können Quenching-Effekte durch Mikroorganismen, Fehler bei der Keimzahlbestimmung oder nicht konstante Milieubedingungen (Aufheizphase, Gleichgewichte) sein [ENGELHARD, 2005]. Basierend auf diesen Abweichungen haben jüngere Untersuchungen und mathematische Modellierungen gezeigt, dass das klassische Modell zur Beschreibung der Inaktivierung von Mikroorganismen, also die Reaktion erster Ordnung, nicht für alle Abtötungskurven geeignet ist. Dies äußert sich grafisch durch den vorher erwähnten nichtlinearen Verlauf der Kurven bei halblogarithmischer Auftragung. Eine Ermittlung der D-Werte nach der traditionellen Methode könnte dabei praktisch eine Über- bzw. Unterschätzung der Inaktivierungswirkung zur Folge haben.

Nach CERF [1977] existieren für mikrobielle Abtötungskurven zwei Konzepte: Das mechanistische und das vitalistische Modell. Grundlagen des mechanistischen Szenarios sind die Annahmen, dass innerhalb einer Mikroorganismenanzucht ähnliche Resistenzen gegenüber dem Letalfaktor vorliegen und die

Inaktivierungskinetik formal einer Reaktion erster Ordnung entspricht [CERF, 1977; ENGELHARD, 2005]. Für die Inaktivierung ist es entscheidend, dass ein oder mehrere "kritische Ziele" in der Zelle zerstört werden. Dieser stochastische Prozess resultiert in lineare Abtötungsverläufe, die von der Mikroorganismenanzahl abhängig sind [PARDEY et al., 2005b]. Variationen im Kurvenverlauf, z.B. ein Tailing, sind nach mechanistischen Modell die Folge ungleichmäßiger Behandlung, dem unterschiedlicher Wirkbzw. Resistenzmechanismen, Mischpopulationen, Agglomeraten oder Messverfahren [CERF, 1977].

Das vitalistische Modell geht von der Hypothese aus, dass innerhalb einer Mikroorganismenpopulation Resistenzvariationen entsprechend einer Weibull-Verteilung existieren. Für die Modellierung der Kinetiken werden von einigen Autoren die folgenden zwei mathematischen Funktionen eingesetzt [PELEG & COLE, 1998/2000; PELEG & PENCHINA, 2000; PARDEY et al., 2005b; ENGELHARD, 2005]:

$$\log S(t) = \log \left(\frac{N}{N_0}\right) = -bt^n = -\left(\frac{t}{t_R}\right)^n$$
(Gl. 8)

$$\log S(t) = \log \left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{t^m}{\left(k_1 + k_2 t^m\right)}$$
(Gl. 9)

Die zweiparametrige Funktion (8) ähnelt einer Weibull-Verteilung und wird für Inaktivierungskinetiken vorgeschlagen, die ein Tailing (n < 1) oder Schulterformen (n > 1) aufweisen. Für n=1 entspricht die Gleichung formal der Reaktion erster Ordnung (Abb. 3).

Durch die dreiparametrige Funktion (9) lassen sich sigmoide Kurvenverläufe darstellen, d.h. Kinetiken, die sowohl ein Tailing als auch Schultern aufweisen [PARDEY et al., 2005b].



Abbildung 3: Modelle nach PELEG mit zwei (links) - bzw. dreiparametrigen (rechts) Funktionen zur Beschreibung nicht-linearer Abtötungsverläufe [PARDEY et al., 2005b].

Die erwähnten Abweichungen treten verstärkt bei der thermischen Abtötung von Mikroorganismen in wässrigen Phasen oder Lebensmitteln auf. Aber auch im Bereich der Packstoffentkeimung lässt sich bei vielen herkömmlichen Methoden wie der Wasserstoffperoxidtechnologie oder der UV-Strahlung ein Tailing beobachten. Das im Rahmen der UV-Entkeimung von Oberflächen auftretende Tailing wird meistens auf den sog. Schatteneffekt zurückgeführt - eine Schutzwirkung durch (Agglomerate, Multilayer) oder Zellanhäufungen staubgebundene Keime. Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben einen zweiphasigen Abtötungsverlauf auch bei der Plasmaentkeimung [HURY et al., 1998; PUREVDORJ et al., 2001]. Als Ursache wird hier ebenfalls der Schatteneffekt genannt, da die UV-Strahlung einen wesentlichen Wirkmechanismus im Plasma darstellt. Oftmals ist das Tailing aber auch lediglich eine Folge des Messverfahrens zur Ermittlung der Kinetiken (z.B. eine Rekontamination des Substrates oder eine Kontamination unbehandelter Teilflächen bei der Verkeimung) und kann als methodisches Artefakt im Sinne des mechanistischen Modells betrachtet werden [ENGELHARD, 2005]. Für die Bestimmung der wirklichen Reaktionszeiten bei Inaktivierungsprozessen von Lebensmitteln oder Verpackungen ist die Ermittlung empirischer Daten obligatorisch und unverzichtbar.

2.1.2 Anforderungen an die Packstoffentkeimung

Für die Gewährleistung einwandfreier Produkte mit langer Haltbarkeit stellt die Lebensmittelindustrie hohe hygienische Ansprüche an Verpackung und Abfüllprozesse. Dabei richten sich die Anforderungen an die Leistungsfähigkeit einer Packstoffentkeimungsvorrichtung maßgeblich nach der mikrobiologischen Ausgangsbelastung der Packstoffe und dem angestrebten mikrobiologischen Zustand des Endproduktes - "steril" oder lediglich "keimreduziert". Bei der Auslegung der Packstoffentkeimung sind zahlreiche produkt- und verfahrenspezifische Aspekte zu berücksichtigen, z.B. die Produkteigenschaften, die Vorbehandlung, die angestrebte Mindesthaltbarkeit oder der Distributionsweg [KuNz, 1988].

2.1.2.1 Mikrobiologische Belastung der Packstoffoberflächen

Ein wesentlicher Punkt bei der Charakterisierung von Entkeimungsprozessen ist die Kenntnis der mikrobiologischen Ausgangsbelastung der Packstoffe. Verpackungsmaterialien wie Glas, Weißblech oder Kunststofffolien sind unmittelbar nach der Herstellung steril. Ein Anstieg der Oberflächenkeimzahl erfolgt durch Reinfektionen beim Handling der Packmittel (Betriebspersonal), durch luftgetragene Keime (Betriebsluft), elektrostatische Aufladung oder durch Verschleppungen in den Anlagen [BUCHNER, 1999; CERNY, 1990]. Zufällig gefundene Daten geben einen groben Überblick über die durchschnittlichen Oberflächenkeimzahlen verschiedener Packmittel (s. Tabelle 1) [BUCHNER, 1999].

Für einige Lebensmittel existieren bereits technische Standards und Leitlinien zur hygienischen Herstellung von Verpackungen sowie Anforderungen an die maximal zulässigen Oberflächenkeimzahlen. Beispiele hierfür sind die Hygiene-Standards der *International Dairy Federation* (IDF) oder der *Food and Drug Administration* (FDA) für Einwegverpackungen von Milch- und Milchprodukten oder die Butter-Verordnung, welche die Oberflächenkeimbelastung von Buttereinwicklern im Sinne der DIN 10082 regelt [IDF, 1995; FDA, 1999; DIN 10082, 1996].

Packmittel	Mittlere Oberflächenkeimzahl
	[KbE/dm ²]
PE-, PP-, PVC-Folien	ca. 2
Verbundfolie mit PVC-Beschichtung	0,6
Karton/Al/PE-Verbund	ca. 2
Al-Verbund	< 1
Al-Folie	0,4-10
Joghurt-Becher, 180 g (PS bzw. PP)	meist < 1
PE-Flaschen	8

Tabelle 1 Oberflächenkeimzahlen verschiedener Packmittel [BUCHNER, 1999].

2.1.2.2 Füllgutspezifische Anforderungen an die Packstoffentkeimung

Die Anforderungen an die Packstoffentkeimung hängen auch stark vom Füllgut bzw. Lebensmittel und dessen Verarbeitung ab. Je nach Zusammensetzung des Lebensmittels kann das mikrobielle Wachstum verlangsamt oder extrem eingeschränkt sein. Dabei spielt das Vorhandensein verschiedener physikalischer oder chemischer Hemmfaktoren wie Lagertemperatur, aw-Wert oder pH-Wert des Lebensmittels eine wesentliche Rolle. In der Lebensmittelmikrobiologie bezeichnet man den gezielten Einsatz kumulativer Hemmeffekte durch Trocknung, Säuerung oder Konservierungsstoffe als Hürdenkonzept [KRÄMER, 2002]. Bei mikrobiologisch unempfindlichen Produkten wie trockenen Lebensmitteln (z.B. Nudeln, Cerealien) mit geringen a_w -Werten (< 0,6) spielt der Keimgehalt der Packmittel keine Rolle, da sich Mikroorganismen bei diesen Bedingungen nicht mehr vermehren können. Nach der FDA ist ein aw-Wert von 0,85 die unterste Grenze für bakterielles Wachstum. Hefen und Schimmelpilze sind bis zu einem aw-Wert von etwa 0,6 noch vermehrungsfähig, können aber durch einen vergleichsweise milden Pasteurisationsprozess inaktiviert werden. Produkte mit hoher initialer Keimbelastung wie Fleisch machen geringere Oberflächenkeimzahlen von

Packstoffen vernachlässigbar. Zusätze von Kon-servierungsstoffen oder saure Lebensmittel mit niedrigen pH-Werten (z.B. Getränke) ermöglichen nur eingeschränktes mikrobielles Wachstum. Lebensmittel mit pH-Werten unter 4,5 verhindern ein Auskeimen bakterieller Endosporen und beschränken das Wachstum auf Hefen, Schimmelpilze und einige adaptierte säurebildende Bakterienstämme, die etwa 10% der Oberflächenkeime ausmachen [BUCHNER, 1999]. Bei diesen genannten Bedingungen ist es ausreichend, die Packstoffentkeimung auf die Inaktivierung der potentiellen Mikroflora auszulegen, wofür gewöhnlich moderate Prozessparameter ausreichen. Die Distribution von Lebensmitteln innerhalb der Kühlkette und die begrenzten Haltbarkeiten reduzieren ebenfalls die Anforderungen bzw. machen eine Packstoffentkeimung sogar unnötig.

2.1.2.3 Verfahrenspezifische Aspekte bei der Packstoffentkeimung

Unter Berücksichtigung der Anfangs erwähnten Produktkategorien "steril" und "keimreduziert" lassen sich generell zwei Konzepte der Packstoffentkeimung ableiten. Der eine Ansatz sieht die partielle Reduktion der Keimzahl auf den Packstoffen vor und führt zu einer verlängerten Haltbarkeit sowie zu einer Verbesserung des hygienischen Status des Füllgutes. Hier gibt es keine allgemeingültigen Vorgaben bezüglich der erforderlichen Keimreduktion auf den Packstoffen.

Auf der anderen Seite gibt es die Sterilisation der Oberfläche, wie sie bei aseptischen Verfahren Anwendung findet. In der Praxis existieren allerdings unterschiedliche Auslegungen für den Begriff "Sterilität", die sich auf die Anforderungen der Packstoffentkeimung auswirken. Nach WALLHÄUBER [1988] bedeutet steril das Fehlen von biologischen Einheiten mit der Fähigkeit, sich zu vermehren oder übertragen. genetisches Material zu Diese Definition entspricht der mikrobiologischen Auffassung von Sterilität. Daneben gibt es aber noch den Begriff "kommerziellen der Sterilität" (Commercial Sterility), der sich im Lebensmittelbereich etabliert hat. Nach BUCHNER [1999] muss bei kommerzieller Sterilität das Produkt in einen Zustand überführt werden, in dem sich Mikroorganismen nicht vermehren können, solange die Lagerbedingungen

eingehalten werden und der Produktzustand sich nicht verändert [BUCHNER, 1999]. Dies ist kritisch zu betrachten, da auch das bloße Vorhandensein nicht vermehrungsfähiger, aber vitaler toxischer Organismen ein Risiko darstellen könnte und nach dieser Definition alle Produkte mit ungünstigen Wachstumskonditionen (z.B. saure Produkte mit pH < 4,5) als "kommerziell steril" gelten. Für bakteriell gefährdete Lebensmittel mit pH-Wert über 4,5 fordert die kommerzielle Sterilität die Inaktivierung aller Mikroorganismen einschließlich der widerstandsfähigen Sporen [BUCHNER, 1999].

Die amerikanische Behörde FDA fordert in ihrem *Code of Federal Regulations* kommerzielle Sterilität für so genanntes "Low-acid food" (Lebensmittel mit pH > 4,6) und die entsprechenden Packmittel. Die Definition der FDA für kommerzielle Sterilität sieht die Abwesenheit pathogener Mikroorganismen (einschließlich Sporen) sowie die Absenz von Mikroorganismen vor, die bei normalen Lagerbedingungen im Lebensmittel vermehrungsfähig wären [FDA, 2003].

Nach einer Schweizer Verordnung von 1987 darf bei kommerziell sterilen Produkten die Keim- bzw. Sporenzahl nach einer 12- bzw. 21-tägigen Inkubation in der Verpackung nicht um mehr als zwei Zehnerpotenzen zunehmen und pathogene Keime in einem Gramm nicht nachweisbar sein [WALLHÄUBER, 1988]. Aus der Sichtweise des Mikrobiologen ist sicherlich die traditionelle Definition der Sterilität, d.h. die Abwesenheit vermehrungsfähiger biologischer Einheiten verbindlich. Da die Inaktivierung der Mikroorganismen einer exponentiellen Funktion entspricht und damit asymptotisch zu Null verläuft, kann theoretisch der "absolute" sterile Zustand nie erreicht werden. Statistisch gesehen ist das Auftreten einer kontaminierten Einheit nur eine Frage der Stückzahl. Für die Praxis ist lediglich die Ausfall- bzw. Unsterilitätsrate maßgebend - also der Anteil unsteriler Verpackungen einer Produktionscharge. In den nachfolgenden Ausführungen ist unter Sterilität die kommerzielle Definition zu verstehen.

Ein steriler Zustand bei verpackten Lebensmitteln kann in der Industrie durch folgende Verfahrensansätze erreicht werden: Durch Heißabfüllung bei sauren Produkten, durch nachträgliches Erhitzen des abgefüllten Produktes in reinfektionssicheren Behältnissen (Konservenindustrie) oder durch die sog. Aseptik. Bei der Heißabfüllung liegen die Produkttemperaturen in einem Bereich von 70-90°C (Pasteurisation), wodurch neben dem Füllgut selbst auch die Verpackung und

die Verschlüsse entkeimt werden. Um dabei die Gefahr einer thermischen Schädigung des Lebensmittels zu minimieren, wird das Produkt unmittelbar in der Verpackung abgekühlt. Allerdings gibt es bei dieser Verfahrensweise zwei limitierende Faktoren: Durch die Hitzeeinwirkung werden nur vegetative Bakterien, Hefen und Schimmelpilze abgetötet, weshalb diese Methode nur für saure Produkte in Frage kommt. Der zweite Aspekt ist das Material der Verpackung. Für die Heißabfüllung eignen sich nur temperaturbeständige Werkstoffe wie Glas, Weißblech, Kartonverbunde oder einige Kunststoffe wie Polypropylen (PP) oder Polyethylennaphthalat (PEN). Letzteres findet allerdings aufgrund der hohen Kosten bis jetzt nur als Zumischung von Copolymerisaten Anwendung [BUCHNER, 1999].

Bei den Getränken (v. a. karbonisierten Produkten und Säften) geht der aktuelle Trend zu Flaschen aus dem Kunststoff Polyethylenterephthalat (PET). Sie sind leicht und transparent, bei gleichzeitig hoher Festigkeit, guten Oberflächeneigenschaften und geringem Verschleiß. Allerdings schrumpft PET in einem Bereich von 70-80°C (Glasübergangstemperatur), weshalb eine Heißabfüllung in diesem Fall eine erhebliche thermische Belastung darstellen würde. Niedrigere Prozesstemperaturen sind aus mikrobiologischer Sicht aber meist unzureichend. Abhilfe könnten hier alternative Materialien bzw. Copolymere (z.B. PEN/PET) schaffen oder eine Erhöhung des kristallinen Anteils des PET, wodurch eine Temperaturstabilität bis ca. 100°C erreicht werden kann. Derartige verpackungstechnische Lösungen bringen aber qualitative Einschränkungen (Einbuße an Transparenz) und sind kostspielig [BUCHNER, 1999]. Eine Möglichkeit der produkt- und materialschonenden Abfüllung, auch bei Verwendung thermolabiler Kunststoffe wie PET, bietet die Aseptik.

Unter Aseptik versteht man im engeren Sinne eine separate Sterilisation der Komponenten Packstoff und Füllgut sowie deren Zusammenführung unter keimfreien Bedingungen. Aus der aseptischen Abfüllung gehen Produkte hervor, die auch ohne Kühlung über einen längeren Zeitraum mikrobiologisch stabil sind. Dabei handelt es sich in der Regel um sog. *low acid food*, d.h. Lebensmittel mit pH-Werten über 4,5 (z.B. Milch oder Fruchtsäfte) und einer Wasseraktivität größer 0,85. Ein wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens liegt in der gesonderten Sterilisation des Füllgutes in Kurzzeiterhitzern, wodurch eine produktschonende Behandlung bei
gleichzeitiger Energieeinsparung möglich wird. Ein Beispiel hierfür ist die Ultrahocherhitzung von Milch bei hohen Temperaturen und kurzen Auf diese Behandlungszeiten in einem Wärmetauscher. Weise können hitzeempfindliche (z.B. und Vitamine Thiamin) erhalten ein hoher Wärmerückgewinnungsfaktor erreicht werden. Andere industrielle Verfahren zur Herstellung steriler Produkte, wie die vorher erwähnte Heißabfüllung oder eine nachträgliche Erhitzung des abgefüllten Gutes in der Verpackung, sind meist energetisch ungünstig oder verursachen eine Wärmeschädigung des Produktes. Die Aseptik ist also ein ökonomisches Verfahren, welches zur Erhaltung der sensorischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften beiträgt. Durch die separate Sterilisation von Füllgut und Verpackung und der Abfüllung unter keimfreien Bedingungen ist eine "kalte" Abfüllung des Produktes möglich, wodurch thermolabile Materialien wie Kunststoffe als Packstoff eingesetzt werden können. Als weitere Vorteile sind die Lagerbarkeit aseptischer Produkte bei Raumtemperatur, ein geringerer Raum- und Personalbedarf, reduzierte Prozessenergie oder Einsparungen bei den Verpackungsmaterialien zu nennen. Dem gegenüber stehen ein hoher technischer und apparativer Aufwand sowie Einschränkungen bei den Füllgütern, die vorwiegend homogene Produkte (wie Milch, Säfte oder Desserts) und flüssige Produkte mit kleineren Partikeln (wie Milchreis oder Soßen) umfassen.

Zum Teil werden aseptische Verfahren auch bei der Abfüllung nicht steriler Produkte eingesetzt. Das Ziel ist dabei eine Verlängerung der Haltbarkeit durch Verhinderung einer Reinfektion mit Schimmelpilzen oder Hefen und eine Einsparung konservierender Agenzien oder einer Wärmebehandlung. Ein Beispiel für nicht sterile Füllgüter in dieser Kategorie sind fermentierte Frischeprodukte wie Joghurt, die in der Kühlkette vertrieben werden und aufgrund ihrer eigenen Mikroflora nur eingeschränktes mikrobielles Wachstum zulassen [REUTER, 1986].

2.1.2.4 Anforderung an die Packstoffentkeimung bei der Aseptik

Nach REUTER [1986] sollte bei nicht sterilen Sauerprodukten mit einem pH-Wert unter 4,5 und vor dem Hintergrund einer Haltbarkeitsverlängerung (meist bei kombinierter Kühllagerung), eine Keimreduktion von etwa drei bis vier Zehnerpotenzen eines geeigneten Richtkeims (z.B. Aspergillus niger) erreicht werden.

Bei sterilen, neutralen und schwach sauren Füllgütern mit einem pH-Wert über 4,5 die auch ohne Kühlung mehrere Monate haltbar sein sollen, wird für einen Richtkeim (z.B. *Bacillus subtilis*) eine Reduktion von sechs Zehnerpotenzen vorgeschlagen. Handelt es sich um Füllgüter, bei denen ein Wachstum des pathogenen *Clostridium botulinum* angenommen werden kann, sollte die Packstoffentkeimung das 12-D-Konzept realisieren, was die Reduktion der Endosporen dieses gefährlichen Bakteriums um mindestens 12 Zehnerpotenzen bedeuten würde [REUTER, 1986].

In den USA wurden in Zusammenarbeit der National Food Processors Association (NFPA) und der nationalen Behörde Food and Drug Administration (FDA) gesetzliche Rahmenbedingungen festgelegt [BUCHNER, 1999]. Die FDA fordert dabei eine kommerzielle Sterilität ("commercial sterility") für Produkte die einen pH-Wert von über 4,6 aufweisen, das sog. "low-acid food" [ANSARI & DATTA, 2003]. Denn theoretisch ist nur bei diesen Lebensmitteln die Gefahr gegeben, dass sich pathogene Keime, wie etwa Salmonellen, vermehren oder die Clostridium botulinum Endosporen auskeimen. Die eigentliche Prüfung der Abfüllanlagen erfolgt durch sog. "process authorities" wie zum Beispiel die NFPA, die folgende Anforderungen an mit Wasserstoffperoxid stellt: Entkeimungsverfahren Mindestens fünf Zehnerpotenzen Reduktion von B. subtilis-Endosporen bei der Packstoff-entkeimung und mindestens vier Zehnerpotenzen bei der Maschinensterilisation [WILKE, 1996]. Innerhalb der europäischen Union gibt es bis heute keine gesetzlich festgelegten

Regelungen über die Mindestanforderungen von aseptisch arbeitenden Maschinen. Für Deutschland wurde vom *Verband deutscher Maschinen und Anlagenbauer* (VDMA) die Richtlinie 8742 über die Mindestanforderungen und Rahmenbedingungen aseptischer Verpackungsmaschinen für die Nahrungsmittelindustrie herausgegeben [VDMA, 2006]. Demnach müssen aseptische Verpackungsmaschinen Mikroorganismen einschließlich Bakteriensporen zuverlässig abtöten. Der Nachweis gilt als erbracht, wenn für Packmittel und Maschineninnenraum eine Keimreduktion von mindestens vier Zehnerpotenzen (bzw. fünf Zehnerpotenzen am Füller) eines bestimmten und für das Entkeimungsverfahren geeigneten Testkeims erreicht wird. Beispielsweise ist bei der Verwendung der Wasserstoffperoxidtechnologie *Bacillus subtilis* SA22 als Testkeim einzusetzen, da seine Endosporen eine hohe Resistenz gegenüber diesem Agens aufweisen. Daraus wird ersichtlich, dass bei der Etablierung eines neuartigen Entkeimungsverfahrens wie der Plasmatechnologie weit reichende Kenntnisse über das mikrobiologische Wirkungsspektrum vorhanden sein müssen, um geeignete Testkeime vorschlagen zu können und den heutigen Anforderungen der Industrie an Packmittelentkeimungsvorrichtungen gerecht zu werden.

2.1.3 Struktureller Aufbau der Mikroorganismen

Um die ausgeprägte Widerstandsfähigkeit vieler Mikroorganismen und die Wirkmechanismen in einem Plasma besser verstehen zu können, ist es erforderlich, den strukturellen Aufbau der vegetativen Zellen und ihrer Sporenform zu kennen. Anhand der isolierten Betrachtung von Zellkomponenten nach einer Plasmabehandlung lassen sich spezifische Schadbilder ableiten und Rückschlüsse auf bevorzugte Angriffspunkte (biological targets) ziehen. Nachfolgend sollen die wesentlichen Bestandteile mikrobieller Zellen und bakterieller Endosporen aufgezeigt werden. Generell kann zwischen prokaryontischen und eukaryontischen Zellen unterschieden werden. Prokaryonten, zu denen die Bakterien und Archaeen gehören, sind zelluläre Lebewesen, die keinen echten Zellkern aufweisen. Dem gegenüber stehen die Eukaryonten wie Hefen oder Pilze, deren Genom in einem von einer Membran umgebenen Zellkern vorliegt. Die wesentlichen Bestandteile einer prokaryontischen Zelle sind die Zellwand, die Cytoplasmamembran, die im Cytoplasma vorliegenden Ribosomen und das Nucleoid (DNS) (Abb. 4) [MADIGAN et al., 2001].



Abbildung 4: Grundstruktur einer prokaryontischen Zelle [Wikipedia: Cell Wall, 2006].

2.1.3.1 Struktureller Aufbau vegetativer Bakterienzellen

Die bakterielle Zellwand trennt das Cytoplasma von der Umwelt. Sie gibt der Zelle ihre spezifische Form und Stabilität. Auf der einen Seite ist sie robust genug dem osmotisch bedingten Turgor der Zelle standzuhalten, weist aber andererseits ausreichend Elastizität auf, um Teilungsvorgänge und Wachstum zu ermöglichen. Eine Klassifizierung von Bakterien ermöglicht die sog. Gramfärbung, die in Abhängigkeit des Färbeverhaltens zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien differenziert und ein wichtiges taxonomisches Merkmal darstellt. Das Prinzip beruht auf einer spezifischen Zellwandstruktur, die grampositive Bakterien nach der Färbung mit einem Kristallviolett-Iod-Komplex und nachfolgendem Entfärbeschritt dunkel-violett erscheinen lässt.

Die Grundsubstanz der grampositiven Zellwand sind die sog. Mureinschichten (etwa 40 Schichten). Murein ist ein Peptidoglykan, bestehend aus den zwei Zuckersäurederivaten N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, die in alternierender Folge β -1,4-glykosidisch miteinander verbunden sind (Glykanrückgrat). Diese Glykanketten sind über Peptidverbindungen aus Aminosäuren quervernetzt und bilden auf diese Weise ein Mureinnetz mit hoher Stabilität. Etwa 90% der Zellwand grampositiver Bakterien besteht aus Murein. Weitere Bestandteile sind die Teichonsäuren, saure Polymere, die in der Zellwand

verankert sind und teilweise durch ihre negative Ladung den Ionentrasport durch die Zellwand beeinflussen können. Einige der Teichonsäuren sind mit Membranlipiden assoziiert (den sog. Lipoteichonsäuren) und wirken als Virulenzfaktoren. Zu den grampositiven Bakterien gehören klassische pathogene Keime und Lebensmittelverderber wie Clostridium botulinum. Bacillus oder cereus Staphylococcus aureus.

Bei gramnegativen Bakterien hingegen macht die Mureinschicht nur etwa 10% der Zellwand aus. Den Hauptanteil bildet die sog. Lipopolysaccharidschicht - ein komplexes System aus Phospholipiden, Proteinasen und Polysacchariden. Strukturell besteht das Lipopolysaccharid aus drei Bereichen: einem O-spezifischen Polysaccharid, einem Kernpolysaccharid und dem Lipid A. Die chemische Zusammensetzung dieser Komponenten variiert gewöhnlich je nach Spezies, wobei das Lipid A, bestehend aus Fettsäuren die über Esterbrücken mit N-Acetylglucosamin verknüpft sind, einen Endotoxinkomplex beinhaltet. Endotoxine sind also Bestandteile der Zellwand vieler gramnegativer Bakterien, wie *Salmonellen* spp. oder *Escherichia* spp., und werden bei der Zelllyse freigesetzt. Ein bekanntes Beispiel für Endotoxine sind die fieberverursachenden Pyrogene, welche einen Risikofaktor bei pharmazeutischen und medizinischen Abfüllprozessen darstellen und aufgrund ihrer ausgeprägten Hitzeresistenz nur schwer zu inaktivieren sind [MADIGAN et al., 2001].

Die Cytoplasmamembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht mit einer Schichtdicke in der Größenordnung von etwa 8 nm. Grundbaustein eines Phospholipids ist der dreiwertige Alkohol Glycerin (Propantriol), das eine Phosphatgruppe aufweist und über Esterbindungen mit Fettsäuren verknüpft ist. Phospholipide haben den gleichen funktionellen Aufbau wie Emulgatoren, da sie sowohl hydrophobe (Fettsäuren) als auch hydrophile Anteile (Glycerin) aufweisen. Rheologisch betrachtet ist die Cytoplasmamembran recht flüssig, mit einer ölähnlichen Konsistenz. Ihre Stabilität erhält sie durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. In der Bakterienzelle übernimmt die Membran die Funktion einer Permeabilitätsbarriere, d.h. sie ist semipermeabel und kontrolliert den Ein- und Austritt gelöster Substanzen auf Basis der Osmose [SCHLEGEL, 1992]. Integrierte Membranproteine spielen eine wichtige Rolle bei Stofftransport, Bioenergetik und Chemotaxis [MADIGAN et al., 2001].

Umschlossen von der Membran ist das Cytoplasma, eine komplexe Mischung von Substanzen und Strukturen, die die Funktionen der Zelle ausführen. Dazu gehören neben Wasser vor allem Makromoleküle, verschiedene anorganische Ionen, kleine Ribosomen. die organische Bausteine sowie die Letztere sind Proteinsyntheseeinheiten in der Zelle und damit ein essentieller Bestandteil. Im Cytoplasma ist auch das Genom in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNS) lokalisiert. In prokaryontischen Zellen liegt die DNS als helikal gewundener Doppelstrang in Form eines ringförmigen Moleküls vor. Die DNS trägt die genetische Information der Zelle in Form von proteinkodierenden Sequenzen, den Genen. Jedem Gen entspricht ein bestimmtes Merkmal oder eine bestimmte Eigenschaft. Die Umsetzung der genetischen Informationen in die komplementären Proteine und Enzyme (Genexpression) erfolgt bei der sog. Transkription in den Ribosomen.

Neben der DNS befindet sich noch ein weiteres Biomolekül im Cytoplasma: die Ribonukleinsäure (RNS). Sie wirkt in Form von drei funktionell und strukturell verschiedenen Unterarten bei der Genexpression mit. Als Messenger-RNS (mRNS) durch Transport der genetischen Information von der DNS zu den Ribosomen, als ribosomale RNS (rRNS), die eine Strukturkomponente der Ribosomen darstellt und als Transfer-RNS (tRNS) bei der Proteinsynthese durch Aktivierung entsprechender Aminosäuren [KNIPPERS, 1985].

Beide Nukleinsäuren (DNS, RNS) sind Polymere so genannter Nukleotide, also eine kovalente Aneinanderreihung biologischer Bausteine in bestimmter Abfolge. Ein Nukleotid besteht aus einem Zucker mit fünf Kohlenstoffatomen, Ribose (RNS) oder Desoxyribose (DNS), einer Stickstoffbase und einem Phosphatrest. Als Nukleosid bezeichnet man den Baustein aus Zucker und Base, ohne Phosphatrest (Abb. 5).

Die Stickstoffbasen können in zwei chemische Klassen unterteilt werden: in Purine wie Adenin und Guanin und in die Pyrimidine Cytosin, Thymin und Uracil. Die einzelnen Nukleotid-Monomere sind über die am Zucker hängenden Phosphatreste durch Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft und bilden auf diese Weise ein Zucker-Phosphat-Rückgrat mit variablen Basen. Die Sequenz, d.h. die Abfolge der Basen, ist spezifisch und enthält die genetische Information. Die DNS liegt in der Zelle als Doppelstrang vor. Sie besteht also aus zwei Nukleotidpolymeren mit einer

Länge von jeweils mehreren Millionen Bausteinen (Nukleotiden), die über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind.



Abbildung 5: Chemischer Aufbau des monomeren Bausteins der DNS, dem sog. Nukleotid [Graphics Gallery, 2006].

2.1.3.2 Struktureller Aufbau bakterieller Endosporen

Endosporen stellen eine Dauerform einiger grampositiver Bakterien dar (z.B. *Bazillen, Clostridien*), die innerhalb der Zelle bei Nährstoffmangel oder Anreicherung von Metaboliten gebildet werden und eine Langlebigkeit von mehreren Jahrzehnten oder länger aufweisen können [MADIGAN et al., 2001]. Bemerkenswert ist die hohe Resistenz der Endosporen gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen wie Säuren, Hitze oder Strahlung, weshalb sie oft als Bioindikatoren bei Entkeimungs- oder Sterilisationsversuchen fungieren (Tab. 2).

	Erforderliche Zeit bzw. Dosis für eine		
Behandlung	Inaktivierung um 90%		
	vegetative Zelle	Endospore	
254 nm-UV-Strahlung [kJ/m ⁻²]	36	330	
feuchte Hitze (90°C) [min]	< 0,1	18	
trockene Hitze (120°C) [min]	keine Daten	18	
Trockene Hitze (90°C) [min]	5	keine Daten	
H ₂ O ₂ (15%, 23°C) [min]	< 0,2	50	
Formaldehyd (25 g/l) [min]	< 0,1	22	

Tabelle 2 Resistenzvergleich zwischen vegetativen Zellen und der Sporenform von *Bacillus subtilis* gegenüber chemische und physikalische Einflüsse [SETLOW, 2006].

Streng genommen sind die multiresistenten Endosporen der Maßstab bei der Auslegung von Sterilisationsverfahren im Lebensmittel- und Medizinbereich. Die hohe Widerstandsfähigkeit im Vergleich zu den vegetativen Formen lässt sich auf einen komplexen mehrschichtigen Aufbau der Endosporen und intrazellulär gebildete Verbindungen zurückführen (Abb. 6).

Die äußerste Lage bildet eine dünne Proteinschicht. An dieses sog. Exosporium schließen sich die äußere (ca. 75-200 nm) und innere (ca. 75 nm) Sporenhülle an, die aus speziellen Sporenproteinen bestehen. Die nachfolgende Schicht ist das sog. Cortex oder Sporenrinde. Sie ist aus Peptidoglycan aufgebaut, allerdings in einem anderen Vernetzungsgrad als in der vegetativen Zelle [SCHLEGEL, 1992].Im Zentrum der Endospore befindet sich der Kern (Core), der in seinem strukturellen Aufbau der vegetativen Zustandsform entspricht: Sporenprotoplast mit Zellwand, Membran, Cytoplasma und Nucleoid [DRIKS, 1999]. Allerdings weist der Kern einige wesentliche Unterschiede auf: Ein geringer Wassergehalt (nur 10-30% der vegetativen Zelle) bedingt eine höhere Viskosität des Cytoplasmas und eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Hitze oder Chemikalien. Des Weiteren enthält der Kern einen hohen Gehalt an einem Calcium-Dipicolinsäure-Komplex und große Mengen an kleinen säurelöslichen Sporenproteinen (SASP), welche mindestens zwei Funktionen aufweisen. Durch Anlagerung an die DNS schützen sie diese vor

potenziellen Schäden durch z.B. UV-Strahlung oder Hitze und sie dienen zudem als Energie- und Kohlenstoffquelle bei der Auskeimung der Endosporen zu einer vegetativen Zelle [MADIGAN et al., 2001]. SCHLEGEL [1992] berichtet von einem Zusammenhang zwischen Hitzeresistenz proportionalen und Gehalt an Die Dipicolinsäure. Undurchlässigkeit der Sporenhüllen die kann Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen Agenzien erklären und eine Pigmentierung trägt häufig zur UV-Resistenz bei [SCHLEGEL, 1992; SETLOW, 2006].



Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts einer *Bacillus subtilis*-Endospore mit komplexem Aufbau aus verschiedenen Hüllen: Exosporium (EX), äußere Sporenhülle (OC), innere Sporenhülle (IC), äußere Membran (OM), Sporenrinde oder Cortex (CX), ursprüngliche Zellwand (PCW) und innere Membran (IM) [BEAMAN et al., 1982].

Im Gegensatz zu den bakteriellen Endosporen, die eine Reaktion der Zelle auf ungünstige Millieubedingungen darstellen, dienen eukaryontische Sporen (z.B. von Pilzen) der Fortpflanzung und Verbreitung über die Luft. Aus diesem Grund weisen Pilzsporen nicht selten eine hohe Resistenz gegenüber Austrocknung und UV-Strahlung auf. Ein gutes Beispiel dafür sind die Konidiosporen von *Aspergillus niger*, die wegen einer schwarzen Pigmentierung der Sporenhülle besonders widerstandsfähig gegenüber UV-Strahlung sind [CERNY, 1990].

Der dargestellte strukturelle Aufbau von bakteriellen Zellen bzw. Endosporen soll einen groben Überblick über ihre wesentlichen Bestandteile und Funktionen bzw. Eigenschaften vermitteln. Bei einer Behandlung mit der kaskadierten Barrierenentladung und ihren diversen Wirkmechanismen wie kurzwellige Strahlung, Radikale und energiereiche Teilchen könnte der biozide Effekt auf vielseitige zelluläre Veränderungen zurückzuführen sein.

2.2 Plasmatechnik

Die Geschichte der Plasmaphysik lässt sich bis ins Jahr 1705 zurückverfolgen, in dem FRANCIS HAUKSBEE mit elektrischen Leuchterscheinungen in evakuierten Glaskugeln experimentierte und bereits 1820 stellte MICHAEL FARRADAY die Frage nach dem 4. Aggregatszustand der Materie [DPG, 2006]. Nach weiteren zahlreichen Entdeckungen in der Plasmaforschung meldete MENASHI schon 1968 ein Patent für die Oberflächenentkeimung mittels Koronaentladung an und im Jahre 2000 arbeiteten in Deutschland weit mehr als 200 Firmen auf dem Gebiet der Niedertemperatur-Plasmatechnik [MENASHI, 1968; DPG, 2006]. Mittlerweile haben sich Plasmaanwendungen in vielen Gebieten etabliert (beispielsweise zur Oberflächenmodifizierung), sind aber im Bereich der Entkeimungsverfahren noch in der Entwicklung oder in vorbereitenden Stadien.

2.2.1 Grundlagen der Plasmatechnik

Der Begriff "Plasma" kommt aus dem Griechischen (Geformtes, Gebildetes) und beschreibt einen gasförmigen Zustand, bei dem die Atome teilweise ionisiert sind [DPG, 2006].

Die aus Atomen und Molekülen bestehende Materie geht in den Plasmazustand über, wenn ihr ausreichend Energie zugeführt wird. Vom Festkörper ausgehend lockert sich mit der wachsenden kinetischen Energie der Atome und Moleküle die Bindung. Man erreicht den flüssigen Zustand und schließlich den gasförmigen Bereich. Die Moleküle bleiben in diesen Aggregatszuständen unversehrt. Erst bei weiterer Zufuhr von Energie (der Ionisationsenergie) brechen die Hüllen der Atome durch Stoßprozesse auf und es entstehen positiv geladene Ionen und negativ geladene Elektronen. Solche Systeme, die einen nennenswerten Umfang ionisierter Komponenten enthalten, bezeichnet man als Plasmen [AWAKOWICZ, 2003]. Nach den klassischen drei Aggregatszuständen fest, flüssig und gasförmig spricht man hier von der vierten Zustandsform der Materie (Abb. 7).



Abbildung 7: Die vier Zustandsformen der Materie [FUBMANN, 2003].

Plasmen sind ubiquitär, allein 99% der Materie des Weltalls liegt im Plasmazustand vor, und haben vielseitige Erscheinungsformen. So bestehen Sterne und interstellare Nebel aus Gasen im vierten Aggregatszustand und auf der Erde findet man Plasmen natürlicherweise in Form von Blitzen, Nordlichtern oder Flammen. Heute werden Plasmen technisch erzeugt und dienen als Grundlage von Lichtquellen, Oberflächenvergütungsverfahren, Kernfusion und vielem mehr [DPG, 2006].

Diese vielseitigen Erscheinungsformen und Verwendungsmöglichkeiten werden durch die großen Temperatur- und Dichtebereiche, in denen die Plasmen existieren, bedingt (Abb. 8). Plasma als ionisiertes Gas setzt sich aus geladenen Teilchen (Ionen, Elektronen) und Neutralteilchen zusammen, wobei letztere in Atome, Moleküle und Radikale unterteilt werden können [AWAKOWICZ & KEIL, 2001]. Dieser Zustand ermöglicht einen elektronischen Stromtransport durch das Gas (eine sog. Gasentladung) und ist eine weitere charakteristische Eigenschaft des Plasmas. Denn normalerweise sind Gase bei nicht zu hohen Temperaturen Isolatoren und erst das Vorhandensein von geladenen Teilchen ermöglicht den Stromfluss [CZICHOS, 2000]. Trotz des gewissen Anteils an freien Ladungsträgern ist das System als Ganzes betrachtet elektrisch neutral oder auch quasineutral.



Abbildung 8: Erscheinungsformen der Plasmen in Abhängigkeit der Elektronendichte und Temperatur [DPG, 2006].

Aufgrund der unterschiedlichen Ladungen der negativen Elektronen und positiven Ionen üben diese Teilchen starke Kräfte aufeinander aus. Dies führt dazu, dass in einem Plasma ein positives Ion von einer kugelförmigen Wolke aus negativen Elektronen umgeben ist, so dass sich die Ladungen in etwa kompensieren. Den Radius dieses kugelförmigen Gebildes nennt man Debye-Länge. Infolge der Temperaturbewegung sind die Elektronen der Wolke dem Ion nicht direkt zugeordnet, sondern befinden sich vielmehr im ständigen Austausch, wobei im Mittel die Quasi-Neutralität des Plasmas für Dimensionen größer als die Debye-Länge erhalten bleibt. Darüber hinaus sind auch die Elektronen von Ionen-Wolken umgeben. Allgemein ist die Debye-Länge von der Teilchendichte und der Temperatur abhängig. Eine Zunahme der Temperatur verschlechtert die ladungsbedingte Abschirmung durch einen Anstieg der Teilchen-Eigenbewegung. Von einem idealen Plasma spricht man, wenn die mittlere Anzahl der geladenen Teilchen in der Debye-Kugel größer als eins und die Debye-Länge viel kleiner als die geometrischen Abmessungen des Plasmas ist. Wie der Abbildung 8 entnommen werden kann, entsprechen die meisten Plasmen diesen Anforderungen. Nicht-ideale Plasmen treten erst bei sehr großen Dichten auf [DPG, 2006].

Die erforderliche Energie zur Plasmaerzeugung kann z.B. durch thermische Ionisierung (Flamme, Glühdraht), adiabatische Kompression oder ionisierende Strahlung (Teilchen- oder Wellenstrahlung) zugeführt werden. Für die Herstellung technischer Plasmen nutzt man den Umstand, dass aufgrund kosmischer und radioaktiver Strahlung in jedem Gasvolumen ein geringer Teil der Atome und Moleküle in ionisierter Form vorliegen. Durch gezielten Einsatz von elektrostatischen oder elektromagnetischen Feldern bzw. durch Anlegen einer Gleichspannung oder eines hochfrequenten Wechselfeldes im Audio- (KHz), Radio-(MHz) oder Mikrowellenbereich (GHz), in ein abgegrenztes Gasvolumen, entsteht ein Plasma [CONRADS & SCHMIDT, 2000]. Bei diesem Vorgang nehmen die freien Elektronen die eingekoppelte Energie auf, werden beschleunigt und treffen auf die Neutralteilchen. In Abhängigkeit der kinetischen Energie der Elektronen können bei diesen Stoßprozessen die Atome und Moleküle sehr effizient angeregt, ionisiert oder dissoziiert werden. Generell lassen sich elastische und unelastische Elektronenstöße unterscheiden, wobei letztere den zentralen und lebenserhaltenden Prozess bei der Generierung von Plasmen darstellen. Elastische Elektronenstöße führen lediglich zu einer nicht-signifikanten Richtungsänderung der Schwerteilchen und sind mit einem minimalen Energieübertrag verbunden, wohingegen unelastische Stöße verschiedene Reaktionen auslösen können.

Bei der Stoßionisation, welche zu den unelastischen Prozessen zählt, verliert das einfallende Elektron mehrere Elektronenvolt an Energie, überträgt sie auf das Molekül und ein weiteres Elektron wird aus der Hülle des Atoms herausgeschlagen. Ein Elektronenvolt (eV) entspricht der kinetischen Energie die ein Elektron beim Durchlaufen eines elektrischen Feldes von einen Volt Potenzialdifferenz gewinnt (1 $eV = 1,602 \cdot 10^{-19}$ J) [CZICHOS, 2000]. Als Folge dieses zentralen Vorganges liegen nach der Stoßionisation zwei freie Elektronen (ein primäres und ein sekundäres) aber auch ein ionisiertes Schwerteilchen vor [Abb. 9]. Die Stoßionisation führt zu einer lawinenartigen Freisetzung von Elektronen und ist somit prozesserhaltend.



Abbildung 9: Schematische Darstellung der Ionisation durch einen inelastischen Elektronenstoß.

Für die Ionisation sind Energien in der Größenordnung von etwa 15 eV erforderlich, wobei der spezifische Wert von dem jeweiligen Atomaufbau und damit vom verwendeten Prozessgas abhängig ist.

Eine charakteristische Eigenschaft der Gasplasmen ist das Leuchten, welches sehr eindrucksvoll etwa bei den Polarlichtern zu beobachten ist. Diese Erscheinung ist auf die Abgabe elektromagnetischer Strahlung angeregter Atome und Moleküle zurückzuführen, deren Außenelektronen durch die übertragene Energie beim Stoß von einem niedrigeren Energieniveau E_1 in ein energetisch höheres E_2 angehoben wurden. Dieselbe Anregung kann auch durch Absorption eines Lichtquants passender Energie erfolgen (Photoeffekt). Der angeregte Zustand geht meist innerhalb sehr kurzer Zeit (ca. 10^{-8} s) in den Grundzustand über, wobei entsprechend der Bohr'schen Frequenzbedingung ein Lichtquant der Energie E freigesetzt wird (Abb. 10) [CZICHOS, 2000].

$$\mathsf{E} = \mathsf{h}\mathsf{v} = \Delta\mathsf{E} = \mathsf{E}_2 - \mathsf{E}_1 \tag{Gl. 10}$$

Dabei handelt es sich um elektromagnetische Strahlung verschiedener Wellenlängen (UV-, Infrarot-, sichtbares Licht), die einen wesentlichen Anteil bei Entkeimungsvorgängen hat und über den Photoeffekt zu einer weiteren Freisetzung von Elektronen führen kann.



Abbildung 10: Atomare Energiezustände bei Anregung durch einen Elektronenstoß oder Photonenabsorption und Rückkehr in den Grundzustand durch Emission von Licht [CZICHOS, 2000].

Liegt die Energie der Elektronen im Bereich von mindestens 2 eV, können die Stoßprozesse zu einer Spaltung der kovalenten Bindungen im Molekül führen und es entstehen Radikale. Das sind Atome oder Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Elektron, z.B. Hydroxylradikale aus Wasser, die sehr reaktiv sind und plasmachemische Reaktionen ermöglichen, welche unter anderem beim Plasmaätzen genutzt werden.

In der nachfolgenden Auflistung werden einige wesentliche Reaktionen zwischen den Elektronen und den Schwerteilchen in einem Gasplasma in Abhängigkeit von der kinetischen Energie beim Zusammenstoß dargestellt [SCHEUBERT, 2001]:

Ionisation:	$e^- + X \Longrightarrow 2e^- + X^+$	(E > 15 eV)
Anregung:	$e^- + X \Rightarrow e^- + X^*$	(E < 12 eV)
Dissoziation:	$e^- + X_2 \Longrightarrow e^- + X \cdot + \cdot X$	(E > 2 eV)
Anlagerung:	$e^- + X \Longrightarrow X^-$	(E < 1 eV)
Elastischer Stoß:	$e^- + X \Longrightarrow e^- + X$	(E beliebig)

Zu den Reaktionsprodukten in einem Plasma gehören somit elektromagnetische Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge, chemische reaktive Radikale, und beschleunigte Ionen.

2.2.2 Klassifizierung nach der Temperatur

Allgemein kann zwischen Hochtemperaturund Niedertemperaturplasmen unterschieden werden. Da ein Plasma aus den drei individuellen Teilsystemen Elektronen-, Ionen- und Neutralgas besteht, stellt die Temperatur eine komplexe Größe dar. Unterscheiden lassen sich Elektronen-, Ionen- und Neutralteilchentemperatur, die in Mischungen nicht notwendigerweise gleich sein müssen [AWAKOWICZ, 2003]. Elektronen besitzen mit m_e=1/1860 u (atomare Masseneinheit) nur etwa 0,01% der Masse der Atome und Moleküle. Dies hat zur Folge, dass sie in elektrischen Anregungsfeldern eine stärkere Beschleunigung erfahren und somit eine höhere kinetische Energie von mehreren eV aufweisen als die trägeren Schwerteilchen. Daraus resultiert unter den Elektronen eine Energieverteilung, die sehr viel höheren Temperaturen entspricht als die Temperatur der Atome und Moleküle, wenn man bedenkt, dass die kinetische Energie 1 eV etwa 11600 K entspricht [HOLZER, 2003].

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Beträge der Teilchengeschwindigkeiten in einem idealen Gas wird durch die Maxwell-Boltzmann- oder auch maxwellsche Geschwindigkeitsverteilung beschrieben (Gl. 11):

$$\frac{\mathrm{dN}}{\mathrm{N}} = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \left(\frac{\mathrm{m}_{\mathrm{M}}}{\mathrm{k}_{\mathrm{B}}\mathrm{T}}\right)^{\frac{3}{2}} \mathrm{v}^{2} \exp\left(-\frac{\mathrm{m}_{\mathrm{M}}\mathrm{v}^{2}}{2\,\mathrm{k}_{\mathrm{B}}\mathrm{T}}\right) \mathrm{dv} \qquad (Gl. 11)$$

Dieses Gesetz beschreibt den Bruchteil dN/N der insgesamt vorhandenen Teilchen, welche eine Geschwindigkeit zwischen v und v + dv aufweisen. Der Kurvenverlauf ist asymmetrisch und das Maximum kennzeichnet die wahrscheinlichste Geschwindigkeit \hat{v} (Abb. 11).



Abbildung 11: Geschwindigkeitsverteilung nach Maxwell in Abhängigkeit der Temperatur [KUCHLING, 2001].

Eine Zunahme der Temperatur verschiebt das Maximum in Richtung größerer Geschwindigkeit, wodurch die Kurve zwar flacher wird, aber das Integral konstant bleibt, da sich die Anzahl der Teilchen nicht ändert. Zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Bewegungsenergie wird das Maximum der Maxwell-Funktion bestimmt. Daraus ergibt sich folgende Gesetzmäßigkeit:

$$\hat{v} = \sqrt{\frac{2k_{\text{B}}T}{m_{\text{M}}}} = \sqrt{2RT} \qquad (Gl. 12)$$

Bei Berechnungen wird von einer mittleren Geschwindigkeit der Teilchen ausgegangen. Wenn sich die innere Energie eines Gases gleichmäßig auf alle Teilchen verteilt, so stimmen diese auch im Quadrat ihrer Geschwindigkeit überein. Die Wurzel aus dem mittleren Geschwindigkeitsquadrat bezeichnet man als mittlere quadratische Geschwindigkeit $\sqrt{v^2}$ [KUCHLING, 2001]:

$$\sqrt{v^2} = \sqrt{\frac{3k_BT}{m_M}} = \sqrt{3RT}$$
(Gl. 13)

Ein weiterer Mittelwert der Geschwindigkeit ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel aller Geschwindigkeitsbeträge:

$$\overline{v} = \sqrt{\frac{8k_{\rm B}T}{\pi\,{\rm m}}} = \sqrt{\frac{8\,{\rm R}\,{\rm T}}{\pi}}$$
 (Gl. 14)

Als Grundlage für alle weiteren Betrachtungen dient die mittlere quadratische Geschwindigkeit $\sqrt{v^2}$.

Die Geschwindigkeit eines beschleunigten Teilchens (Schwerteilchen oder Elektron) bestimmt seine kinetische Energie und somit letztendlich die Temperatur. Dieser Zusammenhang wird nachfolgend dargestellt. Für die kinetische Energie E_k gilt:

$$E_{k} = \frac{m_{M}v^{2}}{2} \qquad (Gl. 15)$$

Für die Geschwindigkeit v wird die mittlere quadratische Geschwindigkeit $\sqrt{v^2}$ in Gleichung (15) eingesetzt [KUCHLING, 2001]:

$$\overline{E}_{kM} = \frac{m_M \overline{v^2}}{2} = \frac{m_M 3RT}{2} = \frac{3}{2}k_BT$$
 (Gl. 16)

 \overline{E}_{kM} mittlere kinetische Energie eines Teilchens

Daraus wird ersichtlich, dass mit zunehmender kinetischer Energie der Teilchen auch deren Temperatur ansteigt bzw. die Temperatur des Gases der mittleren kinetischen Energie seiner Teilchen proportional ist. In einem zeitlich limitierten Gasplasma (kein energetisches Gleichgewicht) ist der Betrag der erreichbaren kinetischen Energie vom Druck abhängig und wird bestimmt von der freien Weglänge, d.h. der Distanz die ein Teilchen ohne Wechselwirkung mit anderen Teilchen (Kollision) zurücklegt. Für ein ideales Gas lässt sich die mittlere freie Weglänge λ mit der folgenden Gleichung berechnen [CZICHOS, 2000]:

$$\lambda = \frac{1}{\sigma n}$$
(Gl. 17)

Aufgrund ihrer geringen Masse haben die Elektronen keinen Anteil an der spürbaren Gastemperatur, die von der Energie der Schwerteilchen (Atome, Moleküle und Ionen) abhängig ist. Die Temperatur eines Gases ist somit proportional zur mittleren kinetischen Energie seiner Schwerteilchen.

Durch die bereits erwähnten elastischen Stoßprozesse zwischen Elektronen und Schwerteilchen kommt es bei der Kollision zu einer Wechselwirkung, wobei Elektronen kinetische Energie verlieren und diese auf die Atome übertragen. Dies führt zu einem Anstieg der Gastemperatur. Plasmen heizen sich also spürbar auf, wenn bei Zusammenstößen Energie von den Elektronen auf die Schwerteilchen übertragen wird.

Die Erhöhung der Energiezufuhr und des Druckes führt zu einer Zunahme der energieaustauschenden Stöße und es stellt sich mit der Zeit ein thermodynamisches Gleichgewicht ein. In diesem Zustand gleichen sich die Temperaturen zwischen Schwerteilchen und Elektronen an und es entsteht ein heißes Plasma von mehreren 10000 K.

Ein solches Gleichgewichtsplasma kann für die Behandlung von thermosensitiven Polymeren wie PET nicht verwendet werden. Für die Erzeugung nicht-thermischer Plasmen eignen sich somit nur Systeme, bei denen die Elektronen und Schwerteilchen nicht im Gleichgewicht vorliegen. Dies erreicht man bei reduziertem Gasdruck, bei dem die Anzahl der Stoßprozesse durch die quantitativ verringerten Gasmoleküle limitiert ist oder durch ein gepulstes Verfahren, in dem der Stoßprozess erlischt, bevor eine Thermalisierung zwischen Elektronen und Schwerteilchen stattfindet. Die Thermalisierungszeit beträgt unter Normalbedingungen (1013 Pa) etwa 300 ns [TROMPETER, 2001].

2.2.3 Klassifizierung nach dem Druck

Die Stoßprozesse und somit die Eigenschaften des Plasmas werden wesentlich von der Anzahl der Teilchen im Gasvolumen bestimmt und sind damit vom Druck abhängig. Daraus resultiert die Klassifizierung nach Hoch-, Atmosphärendruck- und Niederdruckplasma. MOISAN et. al. [2001] haben gezeigt, dass auch die Temperatur des Afterglow-Plasmas mit dem Druck und der eingekoppelten Leistung steigt, da der Druck mit der Anzahl der Teilchen im Gasvolumen korreliert und dadurch direkt die Häufigkeit der Zusammenstöße regelt [MOISAN et al., 2001]. Da sich die Hochdruckplasmen aufgrund ihrer extrem hohen Temperaturen nicht für die Sterilisation von thermosensitiven Packstoffen eignen, werden sie hier nicht näher erläutert.

2.2.3.1 Niederdruckplasma

Durch das Zünden eines Plasmas im Vakuum (p < 100 Pa), in dem nur wenige Gasmoleküle vorliegen, entsteht ein Niederdruckplasma. Dabei handelt es sich um sog. "kalte" Plasmen mit einer Gastemperatur zwischen 300 und 2000 Kelvin. Die reduzierte Anzahl von Teilchen ermöglicht nur selten Stoßprozesse und dadurch eine große freie Weglänge der Elektronen, die durch die Beschleunigung des elektrischen Feldes hohe kinetische Energien erreichen können. Weil aber die Masse der Elektronen sehr viel kleiner ist als die der Atome, tragen die Elektronen praktisch nicht zum Wärmeinhalt bei [AWAKOWICZ, 2003].

Im Labor werden Niederdruckplasmen in vakuumtauglichen Reaktoren (z.B. aus Edelstahl) erzeugt. Die Energieeinkopplung erfolgt in Form elektrischer Leistung, die als Gleich- oder Wechselstrom eingespeist werden kann. Bei Wechselstrom bieten sich zahlreiche Frequenzen an, deren Verwendung lediglich durch nationale bzw. internationale Gesetze beschränkt ist. Typische Frequenzen sind im Hochfrequenzbereich (HF) 13,56 MHz bzw. 27,12 MHz und im Mikrowellenbereich 2,45 GHz. Während die Energie bei Gleichstrom über metallische Elektroden eingebracht wird, kann die Wechselstromeinkopplung elektrodenlos erfolgen.

Bei Verwendung von Hochfrequenz bieten sich zwei Möglichkeiten an: Das kapazitive Verfahren (CCP) und die induktive HF-Einkopplung (ICP). Bei der CCP wird das Plasma mittels Parallelplattenanordnung innerhalb der Vakuumkammer erzeugt, wobei das primär erzeugte elektrische Feld zwischen den Kondensator-Platten die freien Elektronen mit Energie versorgt. Die induktive Einkopplung ICP arbeitet mit einer planaren oder zylindrischen Spule, welches ein magnetisches Feld generiert, das dielektrische aber auch metallische Wände durchdringt und im Vakuumgefäß ein sekundäres elektrisches Feld induziert [AWAKOWICZ & KEIL, 2001].

Niederdruckplasmen finden zahlreiche Anwendungen unter anderem bei der Herstellung mikroelektronischer Bauelemente (Plasmaätzen) oder bei der Beschichtung von Oberflächen (z.B. Barriereschichten bei PET-Flaschen). Relativ neu ist der Einsatz zur Entkeimung und Sterilisation von Oberflächen. Vorteilhaft sind dabei sicherlich die günstigen thermischen Eigenschaften, die diese Plasmen für nahezu alle Materialien und Geometrien (z.B. Folien, Flaschen) geeignet machen und eine materialschonende und effiziente Keiminaktivierung ermöglichen [AWAKOWICZ & KEIL, 2001, SUBRAMANYAM et al., 2002; SCHNEIDER et al. 2005; HALFMANN et al. 2007]. Das Erfordernis der Vakuumtechnologie macht dieses Verfahren allerdings kostenintensiver als ein Atmosphärendruckplasma.

2.2.3.2 Atmosphärendruckplasma

In einem Atmosphärendruckplasma, welches bei Normaldruck (ca. 10⁵ Pa) erzeugt wird, ist die Anzahl der Schwerteilchen in der Gasphase sehr hoch und es kommt aufgrund der kleinen freien Weglänge zu häufigen Zusammenstößen mit den beschleunigten Elektronen. Die Häufigkeit der Energieübertragung bei Kollision von Elektron und Atom kann durch folgende Gleichung beschrieben werden [STOFFELS et al., 2004]:

$$v^{E} [s^{-1}] = (m_{e}/m_{a})u_{ea}$$

$$u_{ea} = n_{a}\sigma_{ea}v_{e}$$
(Gl. 18)

Daraus ergeben sich bei Atmosphärendruck etwa 10⁸ Kollisionen pro Sekunde – für eine spürbare Gaserwärmung sind etwa 100 bis 1000 Kollisionen erforderlich [STOFFELS et al., 2004]. Die Zündung eines Plasmas bei Atmosphärendruck bedingt einen effektiven Energieaustausch und eine vergleichsweise geringe Elektronentemperatur, die von der kinetischen Energie und somit von der Geschwindigkeit abhängig ist [AWAKOWICZ, 2003].

Aufgrund der häufigen Stöße stellt sich innerhalb kürzester Zeit ein thermisches Gleichgewicht zwischen Elektronen (T_e) und Schwerteilchen (T_i) ein. Es entsteht ein so genanntes Gleichgewichtsplasma ($T_e = T_i$) mit hoher Gastemperatur.

In der Praxis können Atmosphärendruckplasmen im Gleichgewicht Temperaturen von einigen 1000 K bis mehreren 10000 K aufweisen. In vielen Anwendungen ist es allerdings erforderlich die Temperatur auf bestimmte Bereiche zu begrenzen (als Beispiel sei hier die Entkeimung von Kunststoffoberflächen genannt). Für die Erzeugung von Atmosphärendruckplasmen mit nahezu Raumtemperatur gilt es daher, die Gaserwärmung durch sehr kurze Plasmadauern niedrig zu halten. Dafür sind kurzlebige Systeme erforderlich oder Reaktoren mit entsprechender Geometrie, die nur wenig Stöße zuläßt. Für die Praxis stellt der Einsatz bei Umgebungsdruck sicherlich einen Vorteil dar, weil eine kostenintensive Vakuum- oder Schleusentechnik nicht erforderlich ist. Allerdings eignen sich die meisten Systeme nur für die Behandlung flacher Substrate (z.B. Tiefziehfolien). Eine spezielle Variante zur Erzeugung eines Atmosphärendruckplasmas mit niedriger Temperatur stellt die dielektrische Barrierenentladung (DBE) dar.

2.2.4 Barrierenentladung

Barrierenentladungen wurden bereits 1857 von Werner von Siemens für die Ozonerzeugung aus Luft bzw. Sauerstoff entwickelt und finden auch Heute noch Anwendung in diesem Bereich. Weitere Einsatzgebiete dieses Entladungstyps sind Oberflächenmodifikation, Abgas- und Wasserbehandlung oder die Erzeugung von Excimer-Strahlung im ultravioletten Spektralbereich [CONRADS & SCHMIDT, 2000; TROMPETER, 2001].

2.2.4.1 Dielektrische Barrierenentladung (DBE)

Die dielektrisch behinderte Entladung oder stille Entladung ist neben der Koronaentladung eine Variante der Gasentladungen, die bei Atmosphärendruck während der Zündphase nicht-thermische Plasmafilamente mit hohen Der Unterschied beiden Elektronentemperaturen hervorruft. zwischen Gasentladungsformen liegt im Löschmechanismus der Entladungsfilamente: Im Fall der Koronaentladung ist er raumladungsorientiert und bei der Barrierenentladung oberflächenladungsorientiert [TROMPETER, 2001].

Der grundsätzliche Aufbau einer DBE besteht aus zwei Metallelektroden (Hochspannungs- und Erdelektrode) mit ein oder mehreren dielektrischen Barrieren (Isolatoren) dazwischen (Abb. 12) [KLAGES & EICHLER, 2002].



Abbildung 12: Schema der dielektrischen Barrierenentladung.

Dazwischen befindet sich ein Spalt variabler Breite in der Größenordnung von wenigen mm bis cm, der mit einem Prozessgas gespült wird. Als Isolator verwendet man ein elektrisch isolierendes Material, in dem ein elektrisches Feld aufrechterhalten werden kann, ein sog. Dielektrikum (z.B. Keramik, Quarz oder Glas) [CZICHOS, 2000]. Die zu behandelnde Probe wird auf der Erdelektrode platziert.

Das Anlegen einer Wechselspannung von 1 bis 100 kV mit typischen Frequenzen von 10-50 kHz ist notwendig, um die Entladung zu erzeugen, die durch Ausbildung von zahlreichen Mikroentladungen (sog. Plasmafilamenten) charakterisiert ist. Voraussetzung hierfür sind wiederum freie Elektronen, die aufgrund von

Höhenstrahlung und natürlicher Radioaktivität immer zu einem gewissen Anteil vorhanden sind (Maxwell-Verteilung). Das externe elektrische Feld ermöglicht zwischen den Elektroden eine Ionisation durch Stoßprozesse, welche gemäß der Townsend-Formel zu einer exponentiell zunehmenden Elektronendichte von der Kathode zur Anode führt.

$$n = n_0 \exp(\alpha x)$$
 (Gl. 19)

Dieser Vorgang wird auch als Elektronenlawine bezeichnet. Aufgrund ihrer Ladung wandern die entstehenden positiven Ionen zur Kathode und führen dort zur Emission von sog. Sekundärelektronen, denn die Auslösung von Elektronen aus Festkörpern ist durch angeregte Teilchen oder Photonen möglich. Solche Sekundäreffekte werden im zweiten Townsendschen Ionisationskoeffizienten γ zusammengefasst (γ = Anzahl der aus der Kathode emittierten Elektronen pro ionisierenden Stoß im Gasraum) und gleichen Elektronenverluste durch Rekombination oder Diffusion aus. Für folgende Bedingung (Townsendsche Zündbedingung) entsteht eine selbständige Gasentladung:

$$\gamma(\mathbf{e}^{\alpha \mathbf{X}} - \mathbf{1}) \ge \mathbf{1} \tag{Gl. 20}$$

Erreicht die Elektronenzahl im Kopf einer Lawine einen kritischen Wert (~ 10^9), kommt es zu einem elektrischen Durchschlag im Gas. Dabei entstehen die vorher erwähnten Mikroentladungen, d.h. leitfähige Plasmakanäle hoher Elektronendichte (ca. 10^{14} cm⁻³), die aufgrund eines sog. Streamerdurchbruchs gebildet werden [PFLUMM & NEIGER, 2003]. Bei dieser Reaktion lagern sich Ladungsträger an die Oberfläche des Dielektrikums an und schwächen das externe elektrische Feld, was zu einem Auslöschen der Filamente führt und eine sehr kurze Existenzdauer bedingt (1-10 ns). Deshalb spricht man hier von Mikroentladungen im Nanosekundenbereich. Die Stromdichte in den Filamenten beträgt etwa 100-1000 A cm⁻², die Elektronendichte $10^{14} - 10^{15}$ cm⁻³ und die Energie der Elektronen liegt im Bereich von 1-3 eV [CONRADS & SCHMIDT, 2000]. Das eingefügte Dielektrikum fungiert als eine dem Entladungsspalt in Reihe geschaltete Kapazität und dient der Strombegrenzung [RÜCKAUF, 2002]. Darüber hinaus ermöglicht es, dass die Entladungen an einer Vielzahl statistisch gleichverteilter Punkte stattfinden können, so dass eine flächige Plasmabehandlung der kompletten Probenoberfläche gewährleistet wird [HOLZER, 2003]. Der Gasfluss durch den Spalt trägt zur Homogenität bei, da die Filamente über die Wirkungsfläche bewegt werden. Die Selbstterminierung der Entladungsfilamente bedingt die Generierung nicht-thermischer Plasmen [PFLUMM & NEIGER, 2003]. Initiiert durch die Filamente entstehen die plasmaspezifischen Wirkmechanismen (UV-Strahlung, Radikale und Teilchenbeschuss) unmittelbar auf der Probe.

Wesentliche Vorzüge der DBE sind weitgehende Schadstofffreiheit, variable Geometrien, einfacher Aufbau und der Betrieb bei Atmosphärendruck, aufgrund dessen sie einen immer größeren Stellenwert in der angewandten Plasmaforschung erlangt.

Ein gewisser Nachteil dieser Entladungsform stellt der geringe Abstand zwischen den Elektroden (Begrenzung auf flache Substrate) und der filamentäre Charakter bzw. das Erscheinungsbild des Plasmas dar, besonders wenn eine gleichmäßige Oberflächenbehandlung erforderlich ist. Je höher die Anzahl der Mikroentladungen, desto homogener ist das Plasma. Dies wird erreicht, wenn die Teilladung der Filamente sinkt, da die Homogenität durch den Betrag an übertragener Ladung pro Filament beschrieben werden kann und ein geringerer Ladungstransfer die Zahl der Mikroentladungen erhöht. Auf dieser Grundlage wurde am Fraunhofer Institut für Lasertechnik (ILT) die sog. kaskadierte dielektrische Barrierenentladung entwickelt.

2.2.4.2 Kaskadierte dielektrische Barrierenentladung (KDBE)

Die kaskadierte dielektrische Barrierenentladung stellt eine Modifikation der DBE dar. Sie ermöglicht eine effiziente UV-Entwicklung bei gleichzeitig hoher Plasmahomogenität. Dabei liegt der wesentliche Unterschied zur DBE im zweistufigen Aufbau des Reaktors, da bei der kaskadierten Entladung ein weiteres Dielektrikum zwischen den Elektroden eingebracht und so ein zweiter gasgefüllter Spalt erzeugt wird (Abb. 13). Somit handelt es sich um eine Aneinanderreihung oder Kaskade von zwei Entladungsspalten. Bei Anlegen einer Spannung entstehen in beiden Spalten Plasmafilamente mit den charakteristischen plasmaspezifischen

Wirkmechanismen wie Radikale, Teilchenbeschuss (Elektronen, Ionen) und UV-Strahlung. Besteht das untere Dielektrikum aus einem UV-transparenten Material wie Suprasil-Quarz, so liegt im Entladungsspalt eine Kombination aus direktem Plasma und zusätzlicher UV-Strahlung vor. Dies kann die Zahl der Mikroentladungen und damit die Homogenität des Plasmas im unteren Spalt steigern. zugrunde liegende Mechanismus wird als JOSHI-Effekt bezeichnet Der [FALKENSTEIN, 1997a/b; HEISE et al., 2004]. Er beschreibt die Reduktion des Ladungsübertrages pro Filament durch lichtinduzierte Photodissoziation von Molekülen im Plasma, wodurch mehr Entladungskanäle entstehen. Verantwortlich für die Verringerung des Ladungsübertrages sind nach RAMAIAH et al. [1955] durch Lichtenergie gebildete elektronegative Radikale im Gasvolumen, die Elektronen einfangen und dadurch die Leitfähigkeit des Gases vermindern. Nach FALKENSTEIN [1997a] kann UV-Strahlung die Zahl der Mikroentladungen um bis zu 11% erhöhen.



Abbildung 13: Schema der kaskadierten dielektrischen Barrierenentladung.

Alternativ kann als Dielektrikum auch ein sog. Excimer-Strahler verwendet werden. Excimer ist die Kurzform für "excited dimer" und steht für ein kurzlebiges Bindungsprodukt (Dimer) aus homonuklearen Atomen oder Molekülen gleicher Struktur, welches nur im angeregten Zustand besteht. Bei Übergang in den elektronischen Grundzustand zerfällt es in seine atomaren bzw. molekularen Komponenten unter Freisetzung von Energie in Form elektromagnetischer Strahlung bestimmter Wellenlänge. Dabei liegt die entstehende Strahlung im UV- (200 nm $< \lambda$ < 400 nm) oder Vakuum-UV-Bereich (100 nm $< \lambda < 200$ nm). Handelt es sich um eine Bindung von zwei Atomen oder Molekülen unterschiedlicher Struktur, so spricht man streng genommen von einem Exciplex (excited complex) - beide Begriffe werden jedoch im Sprachgebrauch oft verwechselt [OPPENLÄNDER, 2003].

Für die Erzeugung der Dimere nutzt man Edelgase, Halogene oder Gemische beider Gruppen, wobei das ausgewählte Gas bzw. Gasgemisch einen direkten Einfluss auf die emittierte Wellenlänge hat (siehe Tab. 3). Das Reaktionsgas befindet sich in einem geschlossenen System aus zwei parallel angeordneten Suprasil-Quarz-Platten, welche die Transmission auch niedriger Wellenlängen (< 200 nm) ermöglichen und die Funktion des Dielektrikums in der DBE erfüllen.

Edelgas/ Halogen	-	Ne	Ar	Kr	Xe
-			126 nm (0.50)	146 nm (0.47)	172 nm (0.48)
F	158 nm (0.44)	108 nm (0.43)	193 nm (0.35)	249 nm (0.28)	354 nm (0.24)
Cl	259 nm (0.32)		175 nm (0.48)	222 nm (0.31)	308 nm (0.27)
Br	289 nm (0.29)		165 nm (-)	207 nm (0.33)	283 nm (0.29)
Ι	342 nm (0.24)			190 nm (0.37)	253 nm (0.37)

Tabelle 3 Übersicht Excimer/Exciplex-Variationen mit jeweiligen Emissionsmaximum und der theoretisch maximalen Excimer-Fluoreszenzeffizienz [OPPENLÄNDER, 2003].

Die Bildung eines angeregten Atoms erfolgt durch das Anlegen einer Spannung, wodurch freie Elektronen beschleunigt werden und mit den Atomen kollidieren. Dabei wird Energie übertragen, was dazu führt, dass Elektronen im Atom auf ein höheres Energieniveau angehoben werden und das Atom damit anregen.

$$X^0 + e^{-(\text{energiereich})} \rightarrow X^* + e^{-(\text{energiearm})}$$
 (Gl. 21)

Das metastabile Dimer entsteht beim Zusammenstoß von angeregten Atomen mit Gasatomen im Grundzustand. Dabei wird überschüssige Energie von einem dritten Atom aufgefangen.

$$X^* + X^0 + X^0 \to X_2^*$$
 (Excimer) + X^0 (Gl. 22)

Der Excimer zerfällt innerhalb von Nanosekunden unter Bildung von spezifischer UV/VUV-Strahlung und zwei Atomen im Grundzustand [OPPENLÄNDER, 2003].

$$X_2^* \rightarrow 2X^0 + UV / VUV - Strahlung$$
 (Gl. 23)

Somit ist die kaskadierte Barrierenentladung ein Kombinationsverfahren aus gerichteter UV-Strahlung, die von der ersten Stufe, d.h. dem Excimer erzeugt wird und den Mikroentladungen, also einem direkten Plasma, in der zweiten Stufe. Dieser Aufbau wurde konzipiert, um flache Substrate wie Folien oder Deckelplatinen effizient und möglichst materialschonend zu entkeimen.

2.2.4.3 Einfluss des Prozessgases auf die Entkeimungseffizienz der dielektrischen Barrierenentladung

Das Prozessgas ist eine entscheidende Größe bei der Verwendung von Gasplasmen, da es den Anteil bzw. die Art der reaktiven Spezies (z.B. Radikale) im Plasma beeinflusst und die emittierte Strahlung bestimmt.

Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung ist es sicherlich ökonomisch, preisgünstige Prozessgase wie Argon, Stickstoff, Sauerstoff oder Luft (synthetische Luft oder Umgebungsluft) einzusetzen. Spektroskopische Messungen mit verschiedenen Prozessgasen in einer herkömmlichen Barrierenentladung zeigen die optischen Charakteristika der resultierenden Gasentladungen auf (Abb. 14-16) [FRANKEN et al. 2003]. Dabei wird das emittierte Spektrum durch die möglichen Energiezustände der Moleküle bestimmt [HEISE, 2005]. Unter Verwendung von Argon in einer Barrierenentladung bei Atmosphärendruck entsteht vor allem das zweite Kontinuum der Ar₂*-Excimere mit einem Emissionsmaximum bei 126 nm (sog. Vakuum-UV-Strahlung (VUV)). Darüber hinaus bilden sich häufig auch Nebenprodukte durch Gasunreinheiten, wie ein ArO*-Excimer mit intensiver Emission bei 308 nm durch vorhandene Sauerstoffanteile, die sich z.B. durch

Desorptionsprozesse an den Reaktorwänden ergeben (Abb. 14) [FRANKEN et al., 2003].



Abbildung 14: Optisches Spektrum der dielektrischen Barrierenentladung mit Argon als Prozessgas (sinusförmige Anregungsspannung, f = 10 KHz, Elektrodendurchmesser: 12 mm, Spalthöhe: 1 mm). Messung im Bereich 115-230 nm mit einem Minuteman Vakuummonochromator und im Bereich 230-400 mit einem Oriel Spektrographen. Beide Systeme wurden auf eine Bandbreite von 1 nm und relativ zueinander kalibriert. Der Monochromator wurde mit einer Deuterium-Lampe absolut kalibriert [FRANKEN et al., 2003].

Allgemein erzeugen Argonplasmen eine Strahlung mit hoher Intensität im kurzwelligen UV-Bereich und sind dadurch für die Inaktivierung von biologischen Systemen prädestiniert.

Ein Stickstoffplasma hingegen emittiert das zweite positive System der Stickstoffmoleküle, beim Übergang von dem angeregten Zustand N₂(C) in den angeregten Zustand N₂(B). Dabei wird Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 313 - 415 nm abgegeben, mit hoher Intensität bei etwa 337 nm [FRANKEN et al., 2003]. Durch intermediäre Radikalreaktionen mit Sauerstoffmolekülen entstehen Stickoxide (NO), die in einem Bereich von etwa 250 nm emittieren (β -System) und energiereiche UV-Strahlung liefern (Abb. 15).



Abbildung 15: Optisches Spektrum der dielektrischen Barrierenentladung mit Stickstoff als Prozessgas (sinusförmige Anregungsspannung, f = 10 KHz, Elektrodendurchmesser: 12 mm, Spalthöhe: 1 mm) [FRANKEN et al., 2003].

Barrierenentladungen unter Verwendung von Sauerstoff weisen kaum Strahlungsanteile im UV-Bereich ($\lambda < 400$ nm) auf und dienen vor allem der Ozonerzeugung. Die entkeimende Wirkung beruht hier im Wesentlichen auf reaktiven Sauerstoffradikalen und Ozon (O₃) [FRANKEN et al., 2003]. Spektroskopische Messungen bei synthetischer Luft haben gezeigt, dass vor allem das zweite positive System von Stickstoff Strahlung emittiert, aber keine NO-Banden vorliegen (Abb. 16).

Dies spricht dafür, dass ein Teil der eingesetzten Energie für die Spaltung der Sauerstoffmoleküle und die Anregung der Stickstoffmoleküle verbraucht wird. Die Versuche mit Umgebungsluft, die im Gegensatz zur synthetischen Luft geringe Mengen an Wasserdampf enthält, ergaben ein ähnliches Spektrum [HEISE et al., 2004]. Qualitativ liegen keine Unterschiede in den Spektren der einstufigen und kaskadierten Barrierenentladung vor [HEISE, 2005].



Abbildung 16: Optisches Spektrum der dielektrischen Barrierenentladung mit synth. Luft als Prozessgas (sinusförmige Anregungsspannung, f = 10 KHz, Elektrodendurchmesser: 12 mm, Spalthöhe: 1 mm) [FRANKEN et al., 2003].

Von TROMPETER et al. [2002] wurden Untersuchungen zur mikrobiziden Effizienzbestimmung diverser Prozessgase in einer dielektrischen Barrierenentladung mit den Sporen von *B. atrophaeus* DSM 2277 und *A. niger* DSM 1957 durchgeführt. Dabei erwiesen sich die Luft- und Argonplasmen bei der Inaktivierung der beiden Testkeime als besonders leistungsstark (Abb. 17).

Mit den Sauerstoffplasmen (O₂ bzw. O₂ + 8%O₃) hingegen konnten nur geringe Keimreduktionen erzielt werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse auf Grundlage der UV-Emission der Prozessgase lässt sich feststellen, dass besonders die UVemittierenden Gase, wie Argon oder Luft, eine hohe mikrobiologische Abtötung ermöglichen. Im Sauerstoffplasma entstehen vorwiegend Sauerstoffradikale und kaum UV-Strahlung im biologisch wirksamen Bereich zwischen 200-350 nm [TROMPETER et al., 2002]. Damit könnte die UV-Strahlung eine wesentliche Komponente der Plasmawirkung darstellen.



Abbildung 17: Keimreduktion von *A. niger* DSM 1957 und *B. atrophaeus* DSM 2277 (ehemals *subtilis*) in einer Barrierenentladung unter Verwendung verschiedener Prozessgase (Behandlungszeit: 60 s, Leistung: ca. 300 W bzw. 150 W bei Argon-Plasmen) [TROMPETER et al., 2002].

2.3 Wirkmechanismen in einem Plasma

Bedingt durch die in 2.1.2 erwähnten Stoßprozesse, entstehen in einem Plasma unterschiedliche Reaktionsprodukte wie elektromagnetische Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge, chemisch reaktive Spezies, beschleunigte Ladungsträger und lokale Dissipationswärme. Für sich betrachtet kann jeder der genannten Mechanismen Mikroorganismen inaktivieren, allerdings kommen diese im Plasma simultan vor und verstärken ihre entkeimende Wirkung synergistisch.

2.3.1 Ultraviolette Strahlung

Angeregte Atome und Moleküle können bei Rückkehr in den Grundzustand elektromagnetische Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge freisetzen. Das emittierte Strahlungsspektrum im Plasma wird vom verwendeten Prozessgas, dem Druck, der mittleren Energie der freien Elektronen und den Energiezuständen der gebundenen Elektronen bestimmt. Biologisch wirksam ist die entstehende ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung), die sowohl eine abtötende als auch eine mutationsauslösende Wirkung haben kann. Dabei handelt es sich allgemein um energiereiches Licht in einem spektralen Wellenbereich von 380 bis 100 nm, wobei in Abhängigkeit der Wellenlänge zwischen vier Kategorien unterschieden wird: langwellige UV-A-Strahlung (380-315 nm), mittelwellige UV-B-Strahlung (315-280 nm), kurzwellige UV-C-Strahlung (280-200 nm) und Vakuum-UV-Strahlung (200-100 nm) [DIN 5031-7, 1984].



Abbildung 18: Spektrale Wirkungskurve der Zellinaktivierung mit einem Quecksilber-Niederdruckstrahler im Vergleich zur DNS- und Protein-Absorptionskurve [SCHLEGEL, 1992].

Die mikrobizide Wirkung der UV-Strahlung ist zurückzuführen auf eine intrazelluläre Schädigung von Biomolekülen wie Proteinen, Enzymen und der DNS bzw. RNS. Bei Betrachtung des Absorptionsverhaltens von Nukleinsäuren und der spektralen Wirkungskurve wird deutlich, dass ein Großteil der UV-Entkeimung auf einer Zerstörung bzw. chemischen Veränderung des DNS-Moleküls beruht (Abb. 18) [WALLHÄUßER, 1988].

Dabei kommt es unter anderem zur Ausbildung von mutagenen Photoprodukten (z.B. Pyrimidindimere) und Strangbrüchen, die eine Replikation der Bakterienzelle verhindern. Das Absorptionsmaximum der DNS liegt bei 260 nm, weshalb der UV- C-Bereich die keimabtötende Komponente des Lichts darstellt und für eine Entkeimung prädestiniert ist [SCHLEGEL, 1992]. In der Praxis der Desinfektion haben sich UV-C-Strahler mit Emissionsmaxima bei 254 nm etabliert und bewährt. Zum Einsatz kommen dabei sog. Quecksilber-Niederdruck-, -Mitteldruck- oder Excimerstrahler.

MOISAN et al. [2001/2002] berichteten von einem weiteren UV-Mechanismus, der ebenfalls zur Inaktivierung von Mikroorganismen im Plasma beitragen soll. Bei der Photodesorption erfolgt eine Erosion der Zellen intrinsischen durch photoneninduzierte Spaltung chemischer Verbindungen in der Zellwand unter Freisetzung flüchtiger Komponenten [MOISAN et al., 2001/2002]. Die erforderliche Energie für die Dissoziation chemischer Verbindungen ist von der Art der Bindung und den Bindungspartnern abhängig. Eine Übersicht zu den Bindungsenergien einiger organischer Moleküle gibt Tabelle 5 in Kapitel 2.3.2. Bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt die Photonenergie bei etwa 4,8 eV, was ausreichend ist um z.B. Ozon zu spalten. Je geringer die Wellenlänge, desto energiereicher ist die elektromagnetische Strahlung, so dass z.B. Lichtquanten bei 380 nm eine Energie von ca. 3,3 eV aufweisen und bei 10 nm bereits etwa 124 eV. Ab einer Größenordnung von ungefähr 10 eV (ca. 124 nm, VUV-Strahlung) verfügen die Photonen über genug Energie, um Elektronen aus der Hülle der Atome bzw. Moleküle durch Stoßprozesse herauszuschlagen und somit zu ionisieren [MUNZERT, 2004]. Ein bestimmter Grenzwert für den Bereich "ionisierende Strahlung" lässt sich nicht angeben, da die erforderliche Energie zur Ionisation auch von der Gasart abhängig ist [RÖMPP, 1997].

Infolge absorbierender Komponenten (z.B. Trüb- oder Schwebstoffe, Zellwand) hat die UV-Strahlung nur eine geringe Eindringtiefe, weshalb sich diese Technologie beispielsweise nur für eine Oberflächenbehandlung, Raumbestrahlung oder zur Entkeimung von Wasser in dünner Schicht eignet. Bei einer Oberflächenbehandlung wie der Entkeimung von Packstoffen zeigt sich ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens. Da es sich bei UV-Licht um eine sich geradlinig ausbreitende Strahlung handelt, wirken sich Schatteneffekte durch Überlagerungen der Mikroorganismen untereinander (Agglomerate) oder mit Partikeln (z.B. Staub) negativ auf die Inaktivierung aus, so dass diese Technologie in der Praxis nur zur Keimreduzierung und nicht zur Sterilisation eingesetzt wird [KRÄMER, 2002].

Als Messgröße für die UV-Entkeimung gelten die Bestrahlungsstärke und die Bestrahlungsdosis [WALLHÄUßER, 1988]:

Strahlungsleistung =
$$\frac{J}{s}$$

Bestrahlungsstärke = $\frac{Strahlungsleistung}{Fläche}$ = $\frac{J}{m^2 \cdot s}$
Bestrahlungsdosis = $\frac{Strahlungsleistung \times Zeit}{Fläche}$ = $\frac{J}{m^2}$

Die UV-Strahlung hat ein breites mikrobizides Wirkungsspektrum, das sich auf Bakterien, Viren, Hefen und Schimmelpilze erstreckt. Die erforderliche UV-Dosis zur Inaktivierung eines bestimmten Mikroorganismus hängt unter anderem von seiner Morphologie bzw. der Zellstruktur ab.

Mikroorganismen	Dezimaler Reduktionswert [mJ]
Gramnegative Bakterien	
Proteus vulgaris	< 3
Escherichia coli	3-4
Grampositive Bakterien	
Staphylococcus aureus	3-5
Micrococcus luteus	10-20
Sporen von Bacillus subtilis	8-10
Hefen	< 3-10
Pilze	
Penicillium ssp.	20-100
Aspergillus flavus	50-100

Tabelle 4: Empfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber UV-Strahlung (keine Angabe der Wellenlänge) [KRÄMER, 2002].

Dabei zeigen sich Bakteriensporen und manche Schimmelpilze als besonders resistent gegenüber ultravioletter Strahlung (Tab. 4). Ursache dafür ist der komplexe und funktionale Aufbau der Zellen bzw. Sporen, mit zum Teil vorhandenen Pigmentierungen, welche die Strahlung bereits an der Oberfläche absorbieren und dadurch den Zellkern schützen (s. 2.1.3.2).

2.3.2 Chemisch reaktive Radikale

Radikale sind Atome oder Moleküle mit ungepaarten Elektronen, die eine hohe chemische Reaktivität aufweisen und deshalb in plasmachemischen Prozessen wie Ätzen oder Oxidation genutzt werden. Sie entstehen im Plasma bei den Stoßprozessen zwischen Elektronen und Schwerteilchen oder durch Photodissoziation, wenn Energie auf die Neutralteilchen übertragen wird und es dadurch zu einer Spaltung der Atombindung durch direkte Dissoziation oder indirekt durch Anregung des Atoms (Prädissoziation) kommt. Die erforderliche Energie zur Spaltung einer kovalenten Bindung liegt im Bereich von 3 bis 10 eV und ist abhängig von der Bindungsart (z.B. Einfach- oder Doppelbindung) sowie der Elektronegativität der Bindungspartner (Tab. 5).

С–С	3,6 eV	С–Н	4,3 eV
C=C	6,3 eV	С-О	3,7 eV
C=C (aromat.)	5,5 eV	C=O	7,7 eV
N≡N	9,8 eV	C=O (CO ₂)	8,3 eV
O=0	5,2 eV	C–Cl	3,5 eV
H–H	4,5 eV	C–N	2,9 eV

Tabelle 5: Bindungsenergien einiger Moleküle [Holzer, 2003].

Allgemein wird die Bindungsenergie einer chemischen Verbindung zweier Atome in der Einheit kJ/mol angegeben, und stellt den Mindesteintrag für eine Dissoziation der Verbindung dar. Die Energie von Elektronen oder Photonen wird normalerweise in Elektronenvolt (eV) angegeben. Bei der Dissoziation von Molekülen gilt, dass ein
Teilchen mit etwa 1 eV Energie eine Bindung von höchstens 96,5 kJ/mol zu spalten vermag.

Besonders reaktive Radikale sind Sauerstoff- und Stickstoffspezies wie sie zum Beispiel in einem Luftplasma entstehen. Sie können eine ausreichend hohe Lebensdauer aufweisen, um organische Verbindungen zu schädigen. Dabei bilden sich die sog. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie atomarer Sauerstoff (O), Superoxidradikale (O_2) , Ozon (O_3) , Hydroxylradikale (OH) und Stickstoffderivate wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Stickstoffdioxid (NO2). Diese Reaktionsprodukte des Plasmas haben eine starke oxidative und erodierende Wirkung auf unterschiedliche Zellkomponenten (z.B. Zellwand und Membran). Angriffspunkte einer Oxidation sind unter anderem. die ungesättigten Fettsäuren der Lipiddoppelschichten in der Zellmembran, wodurch es zu einem Verlust der Barrierefunktion kommt, oder die oxidative Schädigung diverser Proteine in der Zelle bzw. verschiedener Hüllen durch atomaren oder metastabilen Sauerstoff [LAROUSSI, 2005].

2.3.3 Ladungsträger

Ein weiterer möglicher Mechanismus zur Inaktivierung von Mikroorganismen ergibt sich aus den sehr energiereichen Ionen bzw. Elektronen im Plasma, die in kapazitiv gekoppelten Systemen Energien mit weit über 100 eV aufweisen können. Ein Teilchenbeschuss mit hochenergetischen Spezies kann die strukturelle Integrität von Zellen verändern bzw. zerstören und auf diese Weise Mikroorganismen inaktivieren oder die entkeimende Wirkung von UV-Strahlung im Plasma synergistisch unterstützen [AWAKOWICZ & KEIL, 2001].

MENDIS et al. [2000] und LAROUSSI et al. [2003] beschreiben ein Modell, bei dem die Zellmembran gramnegativer Mikroorganismen durch Ladungsträger geschädigt wird. Das Prinzip beruht hierbei auf elektrostatischen Kräften, die durch Anlagerung von geladenen Teilchen auf der Oberfläche der Zellmembran entstehen und bei Überscheiten der Zugfestigkeit der Membran zur Schädigung führen [MENDIS et al., 2000; LAROUSSI et al., 2003]. In einem Gasplasma entstehen die Wirkmechanismen UV-Strahlung, reaktive Spezies und energetische Teilchen simultan, d.h. die Inaktivierung von Mikroorganismen erfolgt durch die Kombination und Synergie dieser Komponenten. Eine Vereinzelung von Plasmaparametern (z.B. reaktive Spezies oder Teilchenbeschuss) für diagnostische Zwecke und für eine separate Wirkungsbetrachtung, ist mit Ausnahme der UV-Strahlung sehr aufwändig und stellt den Gegenstand aktueller Forschungen dar. In diesem Zusammenhang wurden bereits einige Arbeiten an der Ruhr-Universität-Bochum durchgeführt, zum Beispiel VON KEUDELL et al. [2007] oder RABALLAND et al. [2008]. Die Schwierigkeit bei einer isolierten Bewertung ist sicherlich die fehlende Kenntnis über die synergistischen Vorgänge im Plasma. Allerdings ist die Vereinzelung ein wichtiger Schritt für das Verständnis Plasmawirkung der und für weitere Optimierungsprozesse.

2.4 Polymere Kunststoffe in der Lebensmittelindustrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung eines Niedertemperaturplasmas bei Atmosphärendruck bzw. die sog. kaskadierte dielektrische Barrierenentladung für die Entkeimung einiger ausgewählter lebensmittelrelevanter Kunststoffe grundlegend analysiert. Neben der eigentlichen Entkeimungsleistung sind auch mögliche unerwünschte Modifikationen des Packstoffes zu berücksichtigen. Nachfolgend werden die Strukturen und Eigenschaften wesentlicher lebensmittelrelevanter Kunststoffe erläutert.

2.4.1 Polyethylen (PE)

Die Entwicklung von Polyethylen begann im Jahre 1936 mit der Einführung des Hochdruck-Polymerisationsverfahrens [PIRINGER & BANER, 2000]. Bei diesem Prozess entstehen bei 1400-3500 bar und 150-350°C die sog. *Low Density Polyethylene* (PE-LD): verzweigte Polymere mit niedriger Dichte (0,915 - 0,935 g/cm³) und einem Kristallinitätsgrad von ca. 40-50% [RÖMPP, 1998]. Durch Copolymerisation mit längerkettigen Olefinen kann der Grad an kurzkettigen Verzweigungen von PE-LD verringert werden (*Linear Low Density Polyethylene*). Als Initiator der Polymerisation dienen Radikalbildner wie Sauerstoff oder Peroxide.



Abbildung 19: Monomereinheit des Polyethylens nach IUPAC [RÖMPP, 1998].

Polyethylen mit hoher Dichte (*High Density Polyethylene* – PE-HD) in einem Bereich von 0,94 – 0,965 g/cm³ ist das Resultat des Niederdruckverfahrens, durchgeführt bei niedrigen Drücken (< 60 bar) unter Verwendung heterogener Katalysatorsysteme (Ziegler-Natta-, Philipps-Katalysatoren, Standard Oil-Verfahren etc.). Im Gegensatz zu dem weichen PE-LD, ist das harte PE-HD weitgehend linear und hat Kristallinitätsgrade von 60-80%. Dies ist eine Folge der modifizierten Verfahrensweise bei verringertem Druck, wobei die Kettenübertragungsreaktionen sekundär sind [RÖMPP, 1998].

Mittlerweile existiert eine Vielzahl verschiedener PE-Modifikationen, die in Abhängigkeit des Kristallanteils unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Generell steigen die Dichte und der Kristallanteil mit abnehmendem Verzweigungsgrad. PE ist ein wachsartiger Thermoplast, der je nach Variante in einem Bereich von 80-130°C weich wird und eine gute chemische Stabilität besitzt [PIRINGER & BANER, 2000]. Bei moderaten Temperaturen ist Polyethylen in organischen Lösungsmitteln unlöslich und gegenüber anorganischen Säuren und Laugen indifferent. Die mechanischen Eigenschaften sind weitgehend von der Molekülgröße und dem Verzweigungsgrad der Polymerketten abhängig (Molekülstruktur). Zu den wesentlichen Eigenschaften von PE gehören die Heißsiegelfähigkeit, hohe Elastizität, gute Kältebeständigkeit und eine geringe Barrierefunktion gegenüber Gasen, Fetten oder Aromen. Mit zunehmender Dichte und Kristallanteil lassen sich aber neben den Barriereeigenschaften auch Härte, Streckgrenze und Schmelzbereich von PE erhöhen. Allerdings führt dies zu einer Abnahme der Transparenz, der Stoßfestigkeit und der Kältebeständigkeit. Das Material wird spröde. Die Gaspermeabilität von PE-HD beträgt etwa ein Fünftel von der von PE-LD. Oxidationsvorgänge (wie Autoxidation oder Photooxidation) führen zu einem Abbau von PE und können dessen Struktur verändern. Um eine ausreichende Benetzung und Adhäsion von Lacken oder Farben bei Beschichtungsvorgängen zu gewährleisten, ist aber ein gewisses Maß an Oxidation der PE-Oberfläche erforderlich bzw. wird technisch vorgenommen. Dies erfolgt durch eine Erhöhung der Oberflächenenergie mit sauerstoffbasierten Plasmen (Koronaentladung). Bei der Oxidation können allerdings unerwünschte Fehlaromen, wie ungesättigte Ketone oder Aldehyde, entstehen [PIRINGER & BANER, 2000]. PE-LD besitzt in der Lebensmittelindustrie eine große Bedeutung als funktionelle wasserfeste Siegelschicht bei der Herstellung von Verpackungen wie Kartonverbünden für Getränke oder Deckelplatinen für Becher. Aus PE-LD werden neben Tuben und Behälter auch Folien für Säcke, Beutel und Tragetaschen hergestellt. PE-HD ist der Werkstoff für Kochbeutel, Hohlkörper (Sterilmilch), Transportgefäße (Kanister) und Spritzgussteile [RÖMPP, 1998].

2.4.2 Polypropylen (PP)

Polypropylen besteht aus linearen Kohlenwasserstoffketten und hat damit ähnliche Eigenschaften wie Polyethylen [PIRINGER & BANER, 2000]. Grundbaustein ist das Propen.



Abbildung 20: Monomereinheit des Polypropylens nach IUPAC [RÖMPP, 1998].

Mit seiner Dichte von etwa 0,9 g/cm³ zählt PP zu den leichtesten Thermoplasten [KESSLER, 1996]. Die Herstellung erfolgt durch stereospezifische Polymerisation von Propylen in der Gasphase oder Suspension z.B. mit Ziegler-Natta-Katalysatoren. Dabei entsteht je nach räumlicher Anordnung der CH₃-Gruppe entweder hochkristallines PP (alle CH₃-Gruppen auf einer Seite - isotaktisch), weniger kristallines PP (alternierende Abfolge - syndiotaktisch) oder amorphes Polypropylen

(Anordnung ohne Regel - ataktisch). Die größte technische Bedeutung hat das teilkristalline isotaktische PP.

Zu den Eigenschaften von Polypropylen gehören eine ausgeprägte Wärmebeständigkeit bis etwa 140°C, hohe Härte, Steifheit und Fettbeständigkeit [RÖMPP, 1998]. Allerdings wird es bereits bei Temperaturen unter 10°C brüchig und spröde [KESSLER, 1996]. Um die Funktionen des Werkstoffes zu modifizieren, werden neben dem homopolymeren Material auch Copolymere und elastomere Mischungen (Blends) synthetisiert. Dadurch lassen sich Schlagfestigkeit oder Kältebeständigkeit erhöhen. Die Kunststoffeigenschaften sind im wesentlichen Funktion des Kristallanteils und der molaren Masse. Wie bei Polethylen ist die Chemikalienverträglichkeit recht gut. Aufgrund der hohen Lichtund Oxidationsempfindlichkeit ist aber die Zugabe von Stabilisatoren (UV-Absorber, Antioxidantien) erforderlich [RÖMPP, 1998].

Polypropylen ist ein wichtiges Verpackungsmaterial in der Lebensmittelindustrie. Dabei werden häufig tiefgezogene oder spritzgeformte Behälter für das Verpacken von Brotaufstrichen, Speisefetten oder Molkereiprodukten verwendet. Aufgrund seines hohen Schmelzpunktes und der niedrigen Wasserdampfdurchlässigkeit eignet es sich für Abfüllverfahren mit thermischer Beanspruchung (Heißabfüllung, Sterilisation).

2.4.3 Polystyrol (PS)

Polystyrole gehören zur Gruppe der Thermoplaste und werden durch radikalische Polymerisation aus dem Monomer Styrol synthetisiert.



Abbildung 21: Monomereinheit des Polystyrols nach IUPAC [RÖMPP, 1998].

Aufgrund des ataktischen Molekülaufbaus handelt es sich normalerweise um amorphe Materialien mit einer Glasübergangstemperatur von ca. 90°C. Mittlerweile existieren auch isotaktische teilkristalline Polystyrole. Bedeutende Herstellungsverfahren sind die kontinuierliche und diskontinuierliche Perl- oder Massepolymerisation und die Suspensionspolymerisation. In Gegenwart flüchtiger Kohlenwasserstoffe (Pentan) können durch die Suspensionspolymerisation blähfähige **PS-Perlen** synthetisiert werden, die als Vorstufe für die Schaumstoffproduktion dienen [DOMININGHAUS, 1998]. Produkte aus Styrol-Homopolymeren zeichnen sich durch eine hohe Festigkeit, Steifigkeit, Transparenz und begrenzte chemische Beständigkeit aus (Ausnahme Lösungsmittel, einige Öle und Fette) [KESSLER, 1996]. Allerdings ist dieser Werkstoff relativ empfindlich gegenüber Licht und der damit verbundenen Photooxidation. Nachteilig wirkt sich auch die hohe Zerbrechlichkeit bzw. Sprödigkeit und Permeabilität gegenüber Gasen und Dämpfen aus, weshalb dieses Material für Produkte mit geringer Haltbarkeit oder Waren in der Kühlkette, wie Joghurt oder Eiskrem, geeignet ist [PIRINGER & BANER, 2000]. Eine Verbesserung der spezifischen Eigenschaften kann durch Copolymerisation erfolgen. Aus Kostengründen wird PS aber in vielen Bereichen durch das günstigere PP substituiert. Physiologisch gilt PS als unbedenklich, weshalb es für Lebensmittelverpackungen zugelassen ist. Dabei wird es durch Spritzgießen, Extrudieren und Blasformen zu Folien, Packmitteln oder Schaumstoff verarbeitet. Beispiele hierfür sind Eierbehälter oder Schalen für Fleischwaren. Weiterhin findet Polystyrol Anwendung in ganz unterschiedlichen Bereichen wie Kosmetik, Feinwerk- bzw. Elektrotechnik und Haushaltstechnik.

2.4.4 Polyethylenterephthalat (PET)

PET ist ein linear gesättigter Polyester aus der Gruppe der Polyalkylenterephthalate und wichtigster Vertreter der thermoplastischen Polyester. Die technische Herstellung von PET erfolgt hauptsächlich durch direkte Polykondensation von Ethylenglycol und Terephthalsäure in kontinuierlichen und diskontinuierlichen Prozessen - teilweise auch durch Umesterung von Dimethylterephthalat mit Ethandiol [RÖMPP, 1998].



Abbildung 22: Monomereinheit des Polyethylenterephthalat nach IUPAC [RÖMPP, 1998].

Es wird sowohl in teilkristalliner (opak weiß) als auch in amorpher Form für Verpackungsmaterialien hergestellt. Teilkristallines PET zeichnet sich durch hohe Festigkeit, Steifheit, günstigen Gleit- und Verschleißverhalten sowie hohe Chemikalienbeständigkeit aus. Maßgebend für die physikalischen Eigenschaften (z.B. die Temperaturbeständigkeit) sind der Kristallinitäts- und Polymerisationsgrad. Die Transparenz ist ein wesentliches Merkmal dieses Werkstoffes und steigt mit zunehmendem amorphem Anteil, weshalb vielfach Copolyester mit niedrigen Kristallinitätsgrad (30-40%) synthetisiert werden. Daraus lassen sich Formteile herstellen. die bei großer Wanddicke transparent bleiben. Die Glasübergangstemperatur für teilkristallines PET liegt bei etwa 75°C, während amorphes PET ab ca. 40°C weich wird.

PET gehört zu den thermoplastischen Kunststoffen und kann bei Erwärmung in jede beliebige Form gebracht werden. Die Verarbeitung von PET erfolgt durch Spritzgießen zu Formteilen oder durch Extrusion zu Folien. Der Einsatz von PET als spritzbare Formasse wurde erst möglich, als die Kristallisationsgeschwindigkeit durch den Einsatz von Nukleierungsmitteln erhöht wurde [DOMININGHAUS, 1998]. Wichtiges Einsatzgebiet, ist die Herstellung von Getränkeflaschen aus PET in der Lebensmittelindustrie, die sich durch folgende Eigenschaften hervorheben: hohe Transparenz, mechanische Stabilität, geringes Gewicht sowie niedrige Material- und Verarbeitungskosten. Aus diesen Gründen ist PET ein bevorzugter Kunststoff mit stetig wachsendem Marktanteil. Nachteilig auf das Füllgut wirkt sich die hohe Wasserdampfdurchlässigkeit aus, weshalb PET-Formteile mit Barriereschichten entwickelt werden. Dabei bieten sich zum einen Multilayer-Verpackungen mit einem Sandwich-Aufbau aus zwei PET-Schichten und einer dünnen Barriereschicht (z.B. EVOH) an. Zum anderen bietet sich die Aufbringung dünner Barriereschichten (z.B. SiO_x) auf der Außen- und/oder Innenseite des Polymers an. Da die Glasübergangstemperatur bzw. die Erweichungstemperatur relativ niedrig liegt, sind

PET-Verpackungen für thermische Abfüllverfahren nicht geeignet. Eine Erhöhung der Temperaturbeständigkeit kann aber durch Erhöhung des Kristallanteils oder durch Zumischung des Kunststoffes PEN in einer Größenordnung von 1-10% erreicht werden. Letzteres ist aufgrund der relativ hohen PEN-Materialkosten wirtschaftlich unattraktiv [RÖMPP, 1998].

3 Material und Methoden

3.1 Mikrobiologische Materialien und Methoden

Dieses Kapitel widmet sich den verwendeten Materialien und Testmethoden, die zur Bestimmung der mikrobiziden Leistungsfähigkeit der kaskadierten Barrierenentladung eingesetzt wurden. Dabei werden neben den Testkeimen auch wesentliche Verfahrensschritte zur Herstellung der Bioindikatoren und die Methoden zur Keimzahlbestimmung beschrieben.

3.1.1 Testmethode: Keimreduktionstest (Count-Reduction-Test)

Es existieren zwei gängige Testmethoden für die Ermittlung der Leistungsfähigkeit von Entkeimungsprozessen, die sowohl bei der Packmittel- als auch bei der Maschinensterilisation eingesetzt werden. Der so genannte Keimreduktionstest (Count-Reduction-Test) und der Endpunkttest (Endpoint-Test) [VDMA, 2002]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Effizienz der Plasmabehandlung über den Keimreduktionstests ermittelt. Diese Methode erlaubt die genaue Feststellung der Keimreduktion mit relativ wenig Einzelproben. Beim Keimreduktionstest werden die Substrate mit einer sehr hohen Keimzahl eines geeigneten Modellorganismus kontaminiert, deren vollständige Abtötung nicht von der Behandlung mit der Entkeimungsvorrichtung gefordert wird. So ist gewährleistet, dass nach dem Entkeimungsschritt noch genügend lebensfähige Keime vorhanden sind, deren Anzahl ermittelt wird (mittlere Endkeimzahl \overline{N}). Mithilfe von Referenzproben wird die mittlere Ausgangskeimzahl \overline{N}_0 auf den Proben bestimmt. Aus diesen beiden Werten wird mit Hilfe von Gleichung (24) die Keimreduktion ermittelt.

Keimreduktion =
$$\log_{10}(\overline{N}_0) - \log_{10}(\overline{N}) = \log_{10}\frac{\overline{N}_0}{\overline{N}}$$
 (G1. 24)

3.1.2 Verwendete Mikroorganismen

3.1.2.1 Sporenbildende Mikroorganismen

Tabelle 6 gibt Auskunft über die verwendeten Sporenbildner und ihren Ursprung. Bei der Auswahl der Testkeime diente unter anderem das VDMA-Merkblatt *Prüfung von Aseptikanlagen* als Orientierungshilfe [VDMA, 2002].

Teststamm	Stammbezeichnung und Herkunft
A. niger	DSM 1957
A. niger	DSM 1988
<i>B. atrophaeus</i> (ehemals subtilis)	DSM 2277
B. subtilis	DSM 4181 (SA 22)
B. pumilus	DSM 492
Cl. botulinum Typ A	Uniklinik Leipzig
Cl. sporogenes	DSM 767

Tabelle 6: Eingesetzte bakterielle Sporenbildner und Schimmelpilze

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

Endosporen, vor allem der Gattung *Bacillus*, werden aufgrund ihrer enormen Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen wie Hitze, Strahlung und Chemikalien als Indikatorkeime für Entkeimungsverfahren eingesetzt [ENGELHARD, 2005]. Die Beschreibung des strukturellen Aufbaus und der Resistenzmechanismen von Endosporen erfolgte bereits in Kapitel 2.1.3.2. Endosporen von *B. atrophaeus* bzw. *B. subtilis* finden häufig Anwendung bei der Gassterilisation oder der Wasserstoffperoxidtechnologie, da sie eine besonders ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemikalien und Oxidationsvorgängen besitzen. Nach SETLOW (2006) spielen dabei im Wesentlichen die stark komprimierte Zellmembran als undurchlässige Barriere eine Rolle, die Sättigung der DNS mit sporenspezifischen Proteinen und etwaige Enzyme der Sporenhülle, die chemische Agenzien abbauen

können. Endosporen von *B. pumilus* weisen eine relativ hohe Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung auf und dienen deswegen als Bioindikatoren bei der Strahlensterilisation [PRINCE, 1976]. *Cl. botulinum* Typ A wurde aufgrund seiner enormen Toxizität und seiner Funktion als Leitkeim für das 12-D-Konzept in der Lebensmittelindustrie verwendet. *Cl. sporogenes* ist ein wichtiger Mikroorganismus zur Bewertung von thermischen Entkeimungsverfahren in der Lebensmittelindustrie (z.B. bei der Konservenherstellung) [KRÄMER, 2002]. Die Konidiosporen der Schimmelpilzstämme *A. niger* DSM 1957 und DSM 1988 wurden untersucht, da sie aufgrund ihrer schwarz pigmentierten Zellwand eine hohe Resistenz gegenüber elektromagnetischer Strahlung aufweisen und als Testkeime bei der UV-Entkeimung Einsatz finden [CERNY, 1990].

3.1.2.2 Vegetative Mikroorganismen

Zu den Modellorganismen gehörten auch einige vegetative Keime, die in der nachfolgenden Tabelle 7 aufgelistet sind.

Teststamm	Stammbezeichnung und Herkunft	
Salm. mons	Fa. Kraft, München	
Staph. aureus	DSM 346	
E. coli	DSM 787	
D. radiodurans	DSM 20539	

Tabelle 7: Eingesetzte vegetative Testkeime.

Die obligat pathogene Gattung *Salmonella* und die fakultativ pathogene Gattung *Escherichia* gehören beide zur Familie der *Enterobacteriaceae* und haben eine große Bedeutung in der Lebensmittelbranche: Sie sind häufig Verursacher von Nahrungsmittelvergiftungen wie der Gastroenteritis [KRÄMER, 2002]. Neben ihrer Fähigkeit zur aktiven Toxinproduktion enthält ihre Zellwand (entsprechend dem

Aufbau gramnegativer Mikroorganismen) ein thermoresistentes Endotoxin (Lipopolysaccharid), das bei Zelllysis freigesetzt wird.

Staph. aureus ist ein weit verbreiteter Infektionserreger, der auch bei gesunden Menschen auf der Kopfhaut oder den Schleimhäuten zu finden ist. Staphylokokken sind gegenüber zahlreichen Desinfektionsmitteln sehr resistent und bilden hitzestabile Enterotoxine, welche bei 100°C erst nach einer Stunde deutlich inaktiviert werden [KRÄMER, 2002]. Bei dem rotpigmentierten *D. radiodurans* (ehemals Gattung *Micrococcus*) handelt es sich um einen ubiquitären Luftkeim mit besonders hoher Strahlungsresistenz. Reinkulturen überleben γ -Strahlungsdosen von bis zu 6 Mrad [ANDERSON et al., 1956].

3.1.3 Herstellung der Sporen- und Keimsuspensionen

Die verwendeten Nährmedien und Wachstumsbedingungen der jeweiligen Mikroorganismen sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Im Anhang ist die Zusammensetzung der Nährmedien aufgelistet.

Für die Herstellung der Sporensuspensionen der verschiedenen Bacillus-Spezies wurden Gewebekulturflaschen mit 400 ml PCA-Agar (Plate count agar, Fa. Merck, Darmstadt), angereichert mit 4 mg Mangansulfat zur Begünstigung der Sporulation, mit jeweils 1 ml vegetativer Zellsuspension einer Übernachtkultur im Spatelverfahren beimpft und bei 30°C für 10 Tage kultiviert. Nach einer mikroskopischen Kontrolle (mind. 90% Endosporen im Präparat) wurden die reifen Endosporen mit einer sterilen 0.9%-igen NaCl-Lösung und einem Spatel vom Nährboden abgelöst, zweimal durch Zentrifugation gewaschen und in steriler Ringerlösung (Fa. Oxoid, Wesel) aufgenommen. Schließlich erfolgte ein Pasteurisationsschritt bei 80°C für 20 min, um etwaige vitale vegetative Zellen abzutöten. Gelagert wurden die Sporensuspensionen bei 4°C. Um mögliche Veränderungen der Resistenz durch Langzeitlagerung auszuschließen, wurden die Versuche unmittelbar nach der Herstellung der Suspensionen durchgeführt. In dem Zusammenhang haben Resistenztests auf Basis von Wasserstoffperoxid gezeigt, dass die Widerstandsfähigkeit dieser Endosporen zumindest gegenüber diesem Agens über viele Monate gleich bleibt [KLICHE, 2006]. Ausgehend von drei

Gewebekulturflaschen erhielt man etwa 100 ml Sporensuspension, mit einer Keimzahl von ungefähr 10^9 KbE/ml bei *B. atrophaeus* DSM 2277 und ca. 10^8 KbE/ml bei *B. subtilis* DSM 4181.

Teststamm		Kultivierungsmedium	Inkubation
A. niger	KS	YGC (Merck)	30°C, aerob, 10 d
B. subtilis	ES	PCA (Merck) + 10 ppm MnSO ₄	30°C, aerob, 10 d
B. atrophaeus	ES	PCA (Merck) + 10 ppm MnSO ₄	30°C, aerob, 10 d
B. pumilus	ES	PCA (Merck) + 10 ppm MnSO ₄	30°C, aerob, 10 d
Cl. botulinum	ES	Fleisch-Leber-Agar (Merck)	37°C, anaerob, 14 d
Cl. sporogenes	ES	Hirn-Herz-Agar (Merck)	37°C, anaerob, 14 d
Salm. mons	vZ	CASO Medium (Merck)	37°C, aerob, 1 d
Staph. aureus	vZ	Nährmedium (Merck)	37°C, aerob, 1 d
E. coli	vZ	Nährmedium (Merck)	37°C. aerob, 1 d
D. radiodurans	vZ	Nährmedium (Merck)	30°C, aerob, 1 d

Tabelle 8: Eingesetzte Nährmedien und Wachstumsbedingungen der ausgewählten Testkeime.

ES = Endosporen, KD = Konidiosporen, vZ = vegetative Zellen

Ähnlich war die Anfertigung der Sporensuspensionen der untersuchten *Clostridium*-Stämme. Dabei wurden je 0,1 ml Zellsuspension einer Übernachtkultur auf Fleisch-Leber-Agarplatten (Fa. Merck) ausgespatelt. Die Inkubation erfolgte in Anaerobiertöpfen (Fa. Oxoid) bei 37°C, bis 90-99% der Zellen im lichtmikroskopischen Bild Endosporen aufwiesen (etwa 14 Tage). Für die Erzeugung der anaeroben Atmosphäre wurde das AnaeroGen[™]-System (Sachets mit Ascorbinsäure) der Fa. Oxoid verwendet. Aufreinigung und Pasteurisation der Sporensuspension entsprach demselben Ablauf wie bei den *Bacillus*-Stämmen. Die Aufbewahrung der Suspension erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 4°C. Bei dieser Methode betrug die Ausbeute von 40 Agarplatten etwa 50 ml, mit einer Konzentration von 10^8 KbE/ml bei *Cl. botulinum* und 10^9 KbE/ml bei *Cl. sporogenes*. Für die Keimzahlbestimmungen wurde RCM-Agar (Fa. Merck) verwendet.

Zur Gewinnung von Konidiosporen der *Aspergillus niger*-Stämme wurden YGC-Platten (Yeast extract glucose chloramphenicol, Fa. Merck) mit 0,1 ml Zellsuspension des jeweiligen Stammes angeimpft. Nach einer Inkubation von 10 Tagen bei 30°C wurden die Konidiosporen geerntet. Dazu wurde die Oberfläche des Pilzrasens mit sterilem Seesand versetzt und durch aneinander Klopfen der Petrischalen die Konidiosporen von den Trägern abgetrennt. Dieses Sand-Sporen-Gemisch wurde in steriler Ringerlösung aufgenommen und im Ultraschallbad aufgetrennt (2 min). Der Überstand mit den Konidiosporen wurde abgenommen und bei 4°C gelagert. Hier ergaben 80 Platten etwa 50 ml Suspension mit einer Konzentration von ungefähr 10⁸ KbE/ml.

Die vegetativen Zellen von *Salm. mons, Staph. aureus, E. coli* und *D. radiodurans* wurden jeweils in 100 ml sterilem Flüssigmedium über Nacht angezüchtet. Nach der Inkubationsphase erfolgte ein dreifacher Waschschritt durch wiederholte Zentrifugation (10000 g, 10 min., 20°C) mit anschließender Resuspension des Pellets in sterilem destilliertem Wasser. Die so angefertigten Zellsuspensionen wurden unmittelbar für die Versuche verwendet.

3.1.4 Sprühapparatur

Die homogene Verkeimung der Probenoberflächen mit den verschiedenen Modellorganismen erfolgte mit einer am Fraunhofer IVV entwickelten Sprühapparatur. Das Funktionsprinzip ist in der Abbildung 23 dargestellt. Als wesentliches Element ist dabei die Zweistoffdüse Modell 970/7-1 der Fa. Schlick-Düsen zu nennen, welche die Keim- bzw. Sporensuspensionen fein vernebelt. An der Düse befinden sich zwei Druckanschlüsse - für das Zerstäubungsgas und das Steuergas - wobei letzteres die Zufuhr der Keimsuspension regelt. Beide Gasströme werden durch elektropneumatische Magnetventile gesteuert (MV 1214, Fa. Riegler, Bad Urach), welche über eine Steuereinheit mit einstellbaren Zeitrelais geregelt werden. Dadurch lassen sich die Ventile unabhängig voneinander für festgelegte Zeiten öffnen. Die Keimsuspension befindet sich in einem sterilen Vorratsbehälter und ist über einen Schlauch an die Düse angeschlossen. Zugeführt wird die Suspension über ein Gefälle. Die versprühte Flüssigkeitsmenge wird über die eingestellte Sprühzeit der Steuerluft geregelt. An der Düse selbst kann der Flüssigkeitsdurchsatz an einer Mikrometerschraube und der Durchmesser des Sprühkegels über eine Luftkappe variiert werden.



Abbildung 23: Sprühapparatur zur Erzeugung mikrobiologischer Aerosole.

Düsenherstellers beeinflusst Nach Angabe des eine Änderung des Zerstäubungsluftdruckes direkt das Tropfenspektrum. Dieses ist darüber hinaus auch vorgegebenen Flüssigkeitsdurchsatz, der Luftkappeneinstellung, vom der Oberflächenenergie und der Viskosität der Suspension abhängig. Als Zerstäubungsgas wurde Stickstoff mit einem Ausgangsdruck von 2,5 bar verwendet. Bei den Versuchen wurden die Einstellungen so gewählt, dass ein optisch gleichmäßiges Sprühbild auf der Probenoberfläche resultierte. Entsprechend der Spezifikation der Düse dürfte die mittlere Tropfengröße bei den eingesetzten Parametern bei etwa 20 µm liegen. Um gesundheitliche Risiken durch die biologischen Aerosole zu vermeiden, wurde die Sprühdüse vollständig unter einer

L2-Sterilbank aufgebaut und nur bei geschlossener Frontscheibe in Betrieb genommen.

3.1.5 Mikrobiologische Probenpräparation

Für den erwähnten Keimreduktionstest ist eine künstliche Kontamination der Oberflächen geeigneter Trägermaterialien Voraussetzung. Für die Herstellung der Bioindikatoren dienten desinfizierte PET-Folienabschnitte (Tauchbad mit 70% igen Alkohol) mit einem Format von 6x6 cm² als Trägermaterial, die über ein gravimetrisches Verfahren mit der in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Sprühapparatur und den jeweiligen Modellorganismen beimpft wurden.

Das Ausmaß an Zellaggregaten wird so gegenüber der Methode des Aufpipettierens erheblich vermindert [CERNY, 1977]. Dennoch treten beim Sprühverfahren gelegentlich Zellagglomerate auf, welche Auswirkungen auf die Inaktivierung und das sog. Tailing haben können

Zu Beginn der Sprühverkeimung wurde die Sporen- oder Keimsuspension durch mehrmaliges Waschen aufgereinigt und in sterilem destilliertem Wasser aufgenommen. Dieser Prozessschritt führt zu einer Abtrennung unerwünschter Rückstände, wie den Salzen der Ringerlösung oder Bestandteilen des Nährmediums die sonst, z.B. durch Auskristallisieren auf der Probenoberfläche oder Abschattungseffekten, die Entkeimung beeinflussen könnten. Nach der Aufreinigung erfolgte eine 5-minütige Ultraschallbehandlung um vorhandene Zellagglomerate aufzulösen. Die aufgereinigten Suspensionen wurden unter sterilen Bedingungen in den Vorratsbehälter der Sprühapparatur eingebracht. Der Abstand zwischen Düsenauslass und Probenoberfläche betrug 17,5 cm. Um ein homogenes Sprühbild zu erreichen, wurde die Luftkappenstellung auf den Wert 4 justiert, die Mikrometerschraube für den Flüssigkeitsdurchsatz maximal herausgeschraubt und der Sprühdruck auf 2,5 bar gesetzt. Um eine prozessbedingte Kontamination der Folienrückseite zu vermeiden, wurde durch Auflegen einer sterilen Metallmaske nur eine Teilfläche von 4x4 cm² besprüht. Die Sprühdauer wurde so gewählt, dass etwa 0,01 g der Suspension auf die Folie aufgebracht wurde. Durch geeignete Verdünnung konnte die Keimzahl der Sporensuspension und damit die Keimdichte auf der Probenoberfläche gesteuert werden. Generell sollte die initiale Keimdichte in einer Größenordnung von etwa 10^6 KbE/Folie liegen. Verkeimt wurde eine Fläche von 16 cm². Daraus resultierte eine Belegungsdichte von nahezu 6 x 10^4 KbE/cm². Jede einzelne Probe wurde gewogen und dadurch die aufgebrachte Keimmenge sichergestellt. Nach der Verkeimung wurden die Folien für eine halbe Stunde unter der Sterilbank getrocknet.



Abbildung 24: Homogene Verteilung von *Bacillus atrophaeus*-Endosporen auf einem Objektträger bei Sprühverkeimung (10⁶ KbE/2,5x2,5 cm²).

3.1.6 Keimzahlbestimmung

Unter Keimzahl versteht man allgemein die Anzahl der Einheiten Koloniebildender Mikroorganismen (KbE), da beim Auswerten der Proben nur einzelne Kolonien erfasst werden können [PICHHARDT, 1989]. Für die Keimzahlbestimmung wurden die Folien unmittelbar nach der Plasmabehandlung oberflächlich mit den entsprechenden Vollmedien eingegossen. Diese Methode dient der Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse durch eine Erfassung möglicher Rückseitenkontaminationen und erlaubt eine Ortsauflösung überlebender Mikroorganismen. Dazu wird die behandelte Folienoberfläche mit flüssigem, etwa 40°C warmen Nährboden und einer Pipette beschichtet. Nach der Inkubation werden die Kolonien direkt auf der Folie Eingießverfahren konnte nicht bei unbehandelten ausgezählt. Das den Referenzproben eingesetzt werden, aufgrund der hohen initialen Keimdichte und auch nicht bei den Versuchen mit dem Testkeim A. niger, wegen seines flächigen Wachstums. In beiden Fällen wäre eine Auswertung durch Auszählung der eingegossenen Oberfläche zu ungenau. Der Nachweis erfolgte hier durch Überführung der Proben in sterile PE-Beutel (Stomacherbeutel) mit 100 ml steriler Ringerlösung (Fa. Oxoid) + 0,1 Vol.-% Tensid "Tween 80" (Fa. Merck, Darmstadt) und Abspülen der Zellen bzw. Sporen von der Oberfläche unter Verwendung eines Stomachers (Fa. Seward, Norfolk, UK). Dieses Gerät verfügt über zwei Prallplatten, die durch Aufschlagen auf den PE-Beutel eine turbulente Strömung erzeugen, welche Mikroorganismen von der Oberfläche der Proben abschwemmt. Damit liegt bereits eine Verdünnung von 1:100 (10⁻²) vor, die bei der Keimzahlberechnung zu berücksichtigen ist. Auch bei den externen Plasmabehandlungen am Fraunhofer ILT wurde diese Verfahrensweise eingesetzt. Die Keimzahlbestimmung erfolgte nach entsprechender Verdünnung der Ringerlösung durch das Spiralplattenverfahren, das Kochsche Plattengussverfahren oder durch Membranfiltration.

Die Spiralplattenmethode wurde bei den Bakterien eingesetzt und eignet sich für Proben mit hohen Keimzahlen (z.B. Referenzen mit 10^6 KbE/Objekt). Dabei wird eine definierte Probenmenge (hier 50 µl) logarithmisch in Form einer Archimedesspirale, also in abnehmender Konzentration, auf eine sich drehende Petrischale aufgebracht. Auf diese Weise erreicht man eine tausendfache Verdünnung auf einer einzigen Platte, wodurch die Anzahl der erforderlichen Verdünnungen reduziert wird. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde der Spiralplater *Eddy Jet* (Fa. IUL, Königswinter) verwendet. Die Auswertung der gewachsenen Kolonien erfolgte mit Hilfe des automatischen Bildanalysegeräts *Countermat Flash* (Fa. IUL).

Beim Kochschen Plattengussverfahren wird 1 ml der verdünnten Ringerlösung in eine leere Petrischale pipettiert und mit 10-12 ml temperierten Nähragar gemischt. Die Verdünnungsstufe wird so gewählt, dass Petrischalen mit Koloniezahlen zwischen 10-200, höchstens 300 zu erwarten sind. Bei der Membranfiltration werden definierte Volumina der Ringerlösung durch einen sterilen Mikrofilter gesaugt und auf diese Weise die suspendierten Mikroorganismen angereichert. Anschließend werden die Filter auf geeignete Nährbodenplatten gelegt und inkubiert. Diese Methodik findet Anwendung wenn die Keimzahl unter 10 KbE/ml liegt. In den Versuchen wurde für die Filtration meistens 10 ml und 70 ml Ringerlösung eingesetzt. Die nach diesen Methoden hergestellten Nährbodenplatten wurden unter den entsprechenden Bedingungen (siehe 3.1.3) für mindestens drei Tage inkubiert und anschließend ausgezählt.

3.1.7 Versuchsauswertung und Darstellung der Ergebnisse

Um statistisch gesicherte Ergebnisse zu erhalten, wurde gewöhnlich jeder Messpunkt eines Versuches mindestens dreimal aufgenommen. Nachfolgend werden die Auswertung der Messwerte und die Darstellung der Resultate aufgezeigt.

3.1.7.1 Berechnung der Keimzahlen auf einem Probenträger

In der Regel wurden die Proben oberflächlich mit Nährmedium eingegossen und die Keimzahlen direkt auf der Oberfläche bestimmt. Bei den unbehandelten Referenzen und den Proben mit *A. niger*-Konidiosporen wurden die Mikroorganismen mittels Ringerlösung + Tween 80 von der Oberfläche abgelöst und mit verschiedenen mikrobiologischen Methoden (s. Kap. 3.1.6) untersucht. Beim Plattenguss- und beim Spiralplattenverfahren lagen für dieselbe Probe Ergebnisse von mehreren parallel angelegten Nährbodenplatten und Verdünnungsstufen zugrunde. In diesem Fall wurde der einfache arithmetische Mittelwert bestimmt [PICHHARDT, 1989]. Die Keimzahl N die sich auf einem Probenträger befand, wurde mit den folgenden Formeln berechnet:

Spiralplattenverfahren:
$$N/Probe = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} (N_i \cdot S_i) \cdot d$$
 (Gl. 25)

Plattengussverfahren:
$$N/Probe = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} N_i \cdot d$$
 (Gl. 26)

Filtrationsmethode: $N/Probe = \frac{1}{V_u} \cdot \sum_{i=1}^n N_i \cdot V_G$ (Gl. 27)

3.1.7.2 Ermittlung der Abtötung und grafische Darstellung

Das Ausmaß der mikrobiellen Inaktivierung wurde durch die logarithmische Abtötung entsprechend dem Keimreduktionstest angegeben (s. 3.1.1). Bei Verwendung von Ergebnissen mehrerer Proben gleicher Versuchsvariablen, wurde der arithmetische Mittelwert \overline{N} gebildet.

$$\overline{N} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} N_i$$
(Gl. 28)

Als Streumaß bei der Bestimmung der Keimzahl fand die Standardabweichung s_x Anwendung:

$$s_{X} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^{n} (N_{i} - \overline{N})^{2}}$$
(Gl. 29)

Für die graphische Darstellung wurde die Keimzahl logarithmisch über der Zeit aufgetragen. Dabei wurden die einzelnen Messpunkte mit Linien verbunden – dies soll keinen Kurvenverlauf implizieren, sondern entspricht der üblichen mikrobiologischen Darstellungsweise. Bedingt durch Schwankungen beim künstlichen Verkeimen der Proben waren die Ausgangskeimzahlen nicht immer identisch. Um in diesem Fall die Abtötungsverläufe miteinander vergleichen zu können, wurde die auf den Ausgangswert N₀ normierte Keimzahl log_{10} (N/N₀) dargestellt [ENGELHARDT, 2005].

3.1.8 Färbemethode nach Gram

Zum Nachweis von plasmainduzierten Zellwandschäden mittels Gram-Färbung dünne Deckgläser (24x60 mm²) mit vegetativen Zellen einer wurden Übernachtkultur von B. atrophaeus inokuliert. Die Verkeimung erfolgte über das Sprühverfahren, wobei lediglich eine Fläche von 1 cm² mit etwa 10⁵ KbE versetzt wurde. Nach diesem Verfahrensschritt wurden die Proben unter der Sterilbank getrocknet und anschließend in der kaskadierten Barrierenentladung bei ca. 180 W für 0, 1, 3, 5 und 7 s behandelt. Die Gramfärbung wurde mit dem GRAM-Color Färbeset der Fa. Merck durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde die Oberfläche des behandelten Deckglases mit einer Kristallviolettlösung bedeckt, für eine Minute inkubiert und anschließend abgegossen. Etwaige Kristallviolett-Reste wurden mit einer Lugolschen Lösung abgespült. Anschließend wurde die Oberfläche für eine Minute mit der Lugolschen Lösung bedeckt und danach mit destilliertem Wasser gespült. Der Entfärbungsschritt erfolgte durch Schwenken der Proben in einem Aceton-Bad für 60 s. Nach einer Trocknungsphase wurden die Deckgläser im Hellfeld mikroskopiert.

3.2 Plasmaanlage und Probenbehandlung

In diesem Abschnitt werden der technische Aufbau der eingesetzten Plasmaanlage und die Vorgehensweise bei der Probenbehandlung näher beschrieben, als auch eine Vorrichtung zur Konditionierung der Feuchtigkeit von Prozessgasen wie synthetische Luft.

3.2.1 Plasmaanlage

Bei der verwendeten Plasmaanlage handelte es sich um einen Laborreaktor nach dem Prinzip der kaskadierten Barrierenentladung (KDBE), der am Fraunhofer ILT entwickelt wurde (Abb. 25). Wie bereits in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, stellt der Aufbau eine Kombination aus einem Excimer-Flachstrahler und einem direkten

Plasma dar. Von den Abmessungen wurde der Versuchsreaktor so dimensioniert, dass ein Betrieb unter einer Sterilbank möglich ist (Länge 86 cm, Höhe 48 cm, Tiefe 35 cm). Dadurch sollte die Gefahr von Rekontaminationen während des Handlings minimiert werden. Wesentliche Bestandteile dieses sind Geräts der Hochspannungsgenerator, interne Komponenten zur Kühlwasserversorgung und Gaszufuhr sowie der eigentliche Plasmareaktor mit integriertem Flachstrahler. Die ins Plasma eingebrachte elektrische Gesamtenergie wird über die eingekoppelte Leistung und die Behandlungszeit gesteuert, wobei letztere Einflussgröße manuell gemessen wird. Dadurch können Zeiten unter einer Sekunde an diesem Aufbau nicht realisiert werden. Für eine hohe Abtötungseffizienz wurden die Versuche mit der maximal möglichen Leistung durchgeführt, anfänglich ca. 130 W. Ein auftretender Defekt bei den Reaktorspulen erforderte einen Austausch, wodurch die maximal mögliche Leistung gesteigert werden konnte. Mit den neuen Spulen konnten zum Teil Leistungen von bis zu 180 W erreicht werden. Das Prozessgas, in der Regel Umgebungsluft, wird über eine Membranpumpe (Elite 800) kontinuierlich mit einer Durchsatzrate von 800 sccm in den Reaktor gefördert. Unter Umgebungsluft ist in diesem Fall klimatisierte Umgebungsluft zu verstehen, die mit einer Temperatur von etwa 20°C und einer relativen Feuchte von ungefähr 50% in das Labor eingeblasen wird. Die realen Werte unterliegen Schwankungen (z.B. Sonneneinstrahlung, Heizung). Der kontinuierliche Gaszufluss führt zu einer Verteilung der Plasmafilamente im Spalt und trägt damit zur Homogenität der Gasentladung bei. Außerdem dient der Gasfluss dem Gasaustausch im Reaktor, wodurch die Reinheit des Prozessgases und der Abtransport erwärmter Gase gewährleistet werden.

Die kaskadierte Barrierenentladung verfügt darüber hinaus über einen Anschluss für externe Gase. Mit einem Zweiwegeventil lässt sich ein Betrieb von Umgebungsluft auf externes Prozessgas umstellen. Der eigentliche Reaktor setzt sich aus einer Erdelektrode und einer Hochspannungselektrode zusammen, die gemeinsam mit einem Excimer-Flachstrahler im Deckel integriert sind (Abb. 25). Der Excimer-Flachstrahler übernimmt die Funktion des Dielektrikums und besteht aus Suprasil-Quarz mit einer XeBr^{*}-Füllung (282 nm). Mit einer Spalthöhe von 1 mm und einer Strahlerfläche von etwa 11x11 cm² ist dieser Reaktor nur für die Behandlung flacher Substrate von bis zu 10 cm Kantenlänge geeignet. Über einen Abstandshalter lässt sich die Spalthöhe variieren. Die zu behandelnden Proben wurden direkt auf die

Erdelektrode platziert und mit Klebeband fixiert. Nach dem Herablassen des Deckels wurde die Hochspannung angelegt und damit der Excimer-Strahler bzw. das Plasma gezündet.







3.2.2 Vorrichtung zur Gaskonditionierung

Um die Entkeimungseffizienz der Plasmaanlage zu optimieren, erfolgten Versuche mit synthetischer Luft unterschiedlicher relativer Feuchte. Für die Einstellung dieses Parameters wurde ein spezieller Aufbau zur Konditionierung von Gasen verwendet (Abb. 26).

Die Apparatur beinhaltet sowohl einen Gasstrom für das primäre Prozessgas (synthetische Luft, 0% r.F.), als auch für befeuchtetes Prozessgas, die entsprechend der vorgegebenen relativen Gasfeuchte miteinander vermischt werden.



Abbildung 26: Aufbau zur Erzeugung konditionierter Gase mit definierter relativer Feuchte.

Die Steuerung der Gasflüsse zur Erreichung des Soll-Werts erfolgt über elektronische Massenflussregler (*Mass-Flo*1179A, 2000 sccm, MKS Instruments, Berlin), wobei das Verhältnis von trockenem zu feuchtem Gas entsprechend dem Ist-Wert, gemessen mit einem Feuchtesensor (*Therm 8736*, Ahlborn, Holzkirchen), angepasst wird. Für die Befeuchtung des Gases wird zu Beginn ein Teil des zugeführten Gasstroms durch zwei Wasserflaschen geleitet und anschließend dem primären Strom wieder zugeführt. Als Gas wurde kommerzielle synthetische Luft (N₂:O₂ = 80%:20% (v/v)) mit einem Ausgangsdruck von 1 bar in die Apparatur eingeleitet. Der Gasstrom kann durch die Massenflussregler auf maximal 2 l/min (2000 sccm) geregelt werden.

3.2.3 Plasmabehandlung

3.2.3.1 Eigene Experimente

Für die Plasmabehandlung am Fraunhofer IVV wurde die bereits in Kapitel 3.2.1 beschriebene kaskadierte Barrierenentladung verwendet. Die Proben wurden mittig auf der Erdelektrode platziert und der Reaktor anschließend geschlossen. Die Behandlung erfolgte bei maximaler Leistung und dem entsprechenden Prozessgas, in der Regel Umgebungsluft, für eine festgelegte Behandlungszeit. Bei den anfänglich durchgeführten Entkeimungsversuchen betrug die maximal realisierbare Leistung etwa 130 W, in den späteren Experimenten etwa 170-180 W. Eine Änderung der ins Plasma eingekoppelten Gesamtenergie erfolgte durch Variation der Behandlungszeit. Für die Aufnahme der Abtötungskinetiken wurden Zeiten zwischen 0, 1, 3, 5 und 7 s gewählt.

Bei den Untersuchungen zum Einfluss der Luftfeuchte auf die Entkeimungswirkung wurde ein konditioniertes Prozessgas an die KDBE angeschlossen. Dafür wurde trockene synthetische Luft auf relative Luftfeuchten von 0-80% gebracht (s. Kap. 3.2.2). Dabei stellte 80% bei einer Gastemperatur von etwa 20°C die maximal realisierbare relative Luftfeuchte dar. Der Gasfluss betrug 2000 sccm. Um ein möglichst breites Spektrum abzudecken, erfolgte die Erhöhung des Feuchtegehaltes in 10%-Intervallen. Für die Untersuchungen des Einflusses trockener Luft (0% relative Feuchte) auf die Entkeimungseffizienz, wurde synthetische Luft direkt in die KDBE eingeleitet. Der Gasstrom wurde in diesem Fall durch einen Gasflussmesser (Fa. ABB) kontrolliert.

3.2.3.2 Experimente mit Beteiligung vom Fraunhofer ILT

Da der verwendete Laborreaktor unmittelbar zu Beginn dieser Arbeit noch nicht dem Fraunhofer IVV zur Verfügung stand, erfolgten einige Experimente am Fraunhofer Institut für Lasertechnik (ILT) in Aachen. Die kaskadierte Barrierenentladung am ILT ist mit einem Förderband zum Probentransport ausgestattet. Durch Variation der Geschwindigkeit des Förderbandes ermöglichte diese Anlage auch die Untersuchung sehr kurzer Behandlungszeiten unterhalb einer Sekunde. Zusätzlich bestand dort die Möglichkeit diverse Excimer-Flachstrahler in der Plasmaanlage einzusetzen. Am ILT wurden die in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Inaktivierungsversuche durchgeführt, bei denen ein Screening bzgl. der Entkeimungseffizienz unterschiedlicher Prozessgase erfolgte. Bei einer Leistung von 200 W wurden Inaktivierungskinetiken in Abhängigkeit der eingekoppelten elektrischen Gesamtenergie mit den Prozessgasen Argon, Stickstoff, Sauerstoff, Umgebungsluft und synthetischer Luft angefertigt. Weiterhin erfolgten dort auch die Experimente mit verschiedenen Excimer-Strahlern (s. Kap. 4.2.2). Im Rahmen dieser Versuche wurden Abtötungsraten mit der kaskadierten Barrierenentladung und einem installierten XeBr^{*}-Strahler (282 nm) bzw. einem Xe₂^{*}-Strahler (172 nm) bestimmt. Als Prozessgas diente Umgebungsluft und die eingekoppelte Leistung betrug etwa 400 W. Die Bestrahlungsversuche wurden von Herrn Dr. Michael Heise und Herrn Dipl.-Ing. Oliver Franken durchgeführt.

Für beide Versuchsreihen wurden Probenträger mit den Testkeimen *A. niger* DSM 1957 bzw. DSM 1988 und *B. atrophaeus* DSM 2277 verwendet. Als Substrate dienten PET-Folien, die homogen mittels Sprühverfahren inokuliert wurden. Bei allen Testkeimen wurde eine Ausgangskeimdichte von 10^6 KbE/Folie eingestellt.

Nach der Plasmabehandlung erfolgten der Rücktransport der Proben zum Fraunhofer IVV und die mikrobiologische Aufbereitung und Auswertung im Labor. Zu Gunsten einer größeren Anzahl an Messpunkten und Parametersätzen, erfolgten die Experimente ohne Parallelproben. Dadurch sollte eine erste Abschätzung der mikrobiellen Abtötung erfolgen und eine genauere Auflösung des Verlaufs der Kinetik ermöglicht werden. Allerdings traten bei den Ergebnissen von *A. niger* gelegentlich methodisch bedingte Ausreißer auf, die sich im Nachhinein betrachtet nachteilig auf die Festlegung des Kurvenverlaufs und damit die Beurteilung der Inaktivierungskinetik auswirkten.

Wegen eines nicht vertretbaren Aufwands konnten bei den externen Experimenten nicht durchgehend sterile Bedingungen oder mikrobiologisches Handling gewährleistet werden, so dass mögliche Rekontaminationen der behandelten Proben nicht ausgeschlossen werden konnten. Dies könnte in manchen Fällen ein vorhandenes Tailing erklären.

3.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden

Dieser Unterpunkt beschreibt die Materialien und Methoden, die für die molekularbiologischen Untersuchungen zum Zwecke des Nachweises plasmainduzierter DNS-Schäden zum Einsatz kamen.

3.3.1 Mini-Opticon Realtime-PCR System

Das Mini-Opticon der Fa. BIO-RAD ist ein kompaktes System für die Durchführung von Realtime-PCR-Messungen. Mit dieser Methode können bestimmte Abschnitte von Nukleinsäuren auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und gleichzeitig deren Konzentration bestimmt werden. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt über Fluoreszenzmessungen nach jedem PCR-Zyklus und Korrelation mit einer Standardkurve. Für die Erzeugung des elektromagnetischen Signals werden interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe oder mit Fluorophoren markierte Hybridisierungssonden verwendet. Diese lagern sich nach jedem Amplifizierungsschritt an die DNS und dadurch steigt das Fluoreszenzsignal mit der DNS-Vervielfältigung exponentiell an. Nach einer Übergangsphase nähert sich die Fluoreszenz schließlich einem Maximum an.

Als Signalgrenzwert wird eine Fluoreszenzintensität definiert, die etwa der 10fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht. Der Moment des Überschreitens des Signalgrenzwertes wird als Durchbruchszyklus CT (engl.: cycle threshold) oder auch CP (engl.: crossing point) bezeichnet und ist von der Ausgangskonzentration an DNS abhängig [TETZNER, 2006]. Basierend auf dieser Messgröße erfolgt die Konzentrationsbestimmung anhand einer Standardkurve.

Die Anregung erfolgt im Mini-Opticon über 48 Leuchtdioden (LED), die fest im Deckel installiert sind und Fluoreszenzfarbstoffe in einem Bereich von 470-505 nm anregen können. Zwei gefilterte Photodioden messen das emittierte Licht in dem spektralen Bereich von 523-543 nm und 540-700 nm. Diese Anordnung ermöglicht die Detektion zweier unterschiedlicher Farben. Die eigentlichen PCR-Reaktionen, also die Aufheiz- und Abkühlvorgänge, erfolgen in einem Heizblock mit integriertem Peltier-Element, der auch die Einstellung von Temperaturgradienten erlaubt. Durch einen beheizbaren Deckel wird der Wasserverlust im Reaktionsgefäß, bedingt durch die Aufheizvorgänge, vermieden. Ausgelegt ist das Gerät für 48 Proben und gesteuert wird es über die Opticon Monitor[™]–Software.

3.3.2 Eingesetzte PCR-Primer und Sonden

Für die relative Quantifizierung der DNS-Schäden in den *B. atrophaeus*-Zellen bzw. Endosporen, mittels Realtime-PCR, kam das selbst designte Primerpaar 219a/b und die Taqman-Sonde 219 zum Einsatz, die folgende Basensequenzen aufweisen:

Primerpaar 219a (5'-[GAGGTTAAGCCAATCCCACA]-3') Primerpaar 219b (5'-[AATCATCTGTCCCACCTTCG]-3') Taqman 219 (5'-FAM-[CCCGTCACACCACGAGAGTTT]-BHQ-1-3')

Für die Entwicklung der Primer bzw. Sonden wurde die Software *Beacon Designer 4* verwendet. Als Grundlage hierfür diente ein Genabschnitt der 16-sRNS von *B. atrophaeus* (AB021181) aus der Datenbank der NCBI (National Center for Biotechnology Information). Die Taqman-Sonde war an einem Ende mit dem roten Reporter-Fluorophor FAM (Fluorescein) und am anderen Ende mit dem Quencher-Molekül BHQ (Black Hole Quencher[™]) gelabelt. Der Quencher unterdrückt die Fluoreszenz des Fluorophors durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET). Erst während der PCR-Reaktion wird die Taqman-Sonde durch die Polymerase zersetzt, Fluorophor und Quencher voneinander getrennt, um die Fluoreszenz zu messen [LIU et al., 2006]. Die Synthese der Sonden erfolgte durch die Fa. Metabion, Martinsried. Im Rahmen der RAPD-PCR wurde der RAPD-Primer 2 der Fa. GE Healthcare mit der Sequenz (5'-d[GGTGCGGGAA]-3') eingesetzt.

3.3.3 Qualitative und quantitative DNS-Messungen

Da es sich hierbei um aufwändige Messungen handelt, wurden die Untersuchungen nur exemplarisch beim Testkeim *B. atrophaeus* durchgeführt. Für den Nachweis der bakteriellen DNS-Schäden von B. atrophaeus wurden PET-Folienabschnitte mit den Endosporen vegetativen Zellen bzw. sprühförmig inokuliert. Die Ausgangskeimdichte betrug einige 10⁶ KbE/4x4 cm². Nach der Plasmabehandlung mit der kaskadierten Entladung wurden die Zellen/Endosporen in Stomacherbeutel mit 40 ml steriler Ringerlösung + 0.1% Tween überführt und für eine Minute im Stomacher behandelt. Dieser Schritt diente der Ablösung der Keime von der Folienoberfläche. Anschließend wurden die 40 ml zentrifugiert und das Pellet in 2 ml sterilem PCR-Wasser (Fa. Eppendorf, Hamburg) aufgenommen. Diese Suspension diente als Grundlage für die DNS-Isolation unter Verwendung des Gewebekits QIAamp DNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden). Die Durchführung erfolgte nach Anweisung. Dabei findet eine Zelllyse unter Einwirkung des Enzyms Proteinase statt, wobei die DNS freigesetzt wird, welche nach Aufreinigungsschritten für PCR-Reaktionen genutzt werden kann.

Mittels RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA) wurde versucht DNS-Schäden qualitativ nachzuweisen. Diese Technik stellt eine Variante der herkömmlichen PCR dar und verwendet typischerweise ein kurzes Oligonukleotid (10 Basen) mit unbekannten Hybridisierungsorten, kein Primerpaar wie bei der klassischen PCR. Aufgrund mehrfacher Bindungsstellen entstehen bei diesem Verfahren polymorphe Bandenmuster, der sog. Fingerprint [NEWTON & GRAHAM, 1994].

Für die RAPD-PCR wurden kommerziell erhältliche *Analysis Beads* (*Ready-To-Go*, GE Healthcare) verwendet, die alle erforderlichen Reaktionskomponenten wie die DNS-Polymerase, Nukleotidbausteine oder MgCl₂ enthalten. Je Probe wurden 18 μ l hochreines Wasser (Fa. Sigma-Aldrich, Seelze), 5 μ l RAPD-Primer (s. Kap. 3.3.2) und 2 μ l aufgereinigte DNS in ein RAPD *Analysis Bead* pipettiert und miteinander vermengt. Zusätzlich wurde noch eine Wasserkontrolle (20 μ l hochreines Wasser + 5 μ l RAPD-Primer 2) und eine Positivkontrolle (18 μ l hochreines Wasser + 2 μ l *E. coli* Kontroll-DNS + 5 μ l RAPD-Primer) angesetzt. Die eigentliche PCR-Reaktion lief im Realtime-Thermocylcer *MiniOpticon* (Fa. BIO-RAD, München) bei folgendem Temperatur-Zeit-Programm ab:

1 Zyklus: 95°C, 5 min 45 Zyklen: 95°C, 1 min 36°C, 1 min 72°C, 2 min

Die Auftrennung der RAPD-PCR-Produkte erfolgte nach ihrer Größe im Polyacrylamidgel *GeneGel Excel 12.5/24* (Fa. GE Healthcare). Dazu wurden je Probe 4 µl PCR-Produkt mit 2 µl Pufferlösung (s. Anhang) versetzt und nach der Durchmischung ins Gel pipettiert. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte lief zusätzlich ein DNS-Längenstandard (Fa. GE Healthcare) im Gel mit (4 µl Laufpuffer + 2 µl Längenstandard). Die Spannung betrug 600 V bei max. 25 mA und 15 W Leistung. Mit der Silberfärbung *PlusOne* TM *DNA Silver Staining* (GE Healthcare) wurden die Banden der aufgetrennten PCR-Produkte sichtbar gemacht. Die Visualisierung der Gele erfolgte mit der Videodokumentationseinheit *Image Master*[®] (Fa. Pharmacia Biotech).

Versuche zur relativen Quantifizierung der DNS-Schäden erfolgten mittels Realtime-PCR. Als Mastermix wurde der *IQ-Supermix* (Fa. BIO-RAD) verwendet, der alle wesentlichen PCR-Reaktionskomponenten beinhaltet. Ein typischer Reaktionsansatz für die Realtime-PCR wies je Probe folgende Zusammensetzung auf:

iQ-Supermix	12,5 µl
Primer 219a	2 µl
Primer 219b	2 µl
Sonde 219	2 µl
DNS-template	5 µl

In jedem Versuchslauf wurden Doppelproben angesetzt. Das nachfolgende Temperatur-Zeitprogramm wurde experimentell ermittelt und für die quantitative Messung im *Mini-Opticon* verwendet:

1 Zyklus: 95°C, 3 min 45 Zyklen: 95°C, 15 s 58°C, 25 s Fluoreszenzmessung

Die Korrelation der Signalstärke mit der DNS-Menge erfolgte über eine Standardkurve. Dafür wurde ein DNS-Isolat aus einer *B. atrophaeus*-Suspension mit einer Keimdichte von 10^8 KbE/ml herangezogen, in 10er-Schritten bis auf theoretisch 10^2 KbE/ml verdünnt und die Verdünnungen in die Messung eingebracht. Die absolute DNS-Menge wurde nicht bestimmt.

Abbildung 27 zeigt exemplarisch den typischen Kurvenverlauf einer Messung mit der Realtime-PCR und die relative Konzentrationsbestimmung über die Standardkurve:



Abbildung 27: Verlauf der Fluoreszenzmessung bei der quantitativen Realtime-PCR (Bild A) und Standardkurve zur Bestimmung der DNS-Menge (Bild B).

3.4 Verwendete Kunststoffe und Packstoffanalytik

Das vorliegende Kapitel beschreibt die verwendeten Kunststoffe und die Prüfverfahren, die zum Nachweis plasmainduzierter Veränderungen der Materialeigenschaften eingesetzt wurden.

3.4.1 Verwendete Kunststoffe

Im Rahmen der Studien zu den Auswirkungen einer Plasmabehandlung auf die Materialcharakteristika verschiedener lebensmittelrelevanter Kunststoffe, wurden folgende Polymere herangezogen:

- Polyethylenterephthalat (PET), Hostaphan RN, Dicke: 190 μm (Fa. Mitsubishi Polyester)
- Polystyrol (PS), biaxial gereckt, Dicke: 200 μm (Fa. Norddeutsche Seekabelwerke)
- PET/PVDC/PE-LD-Verbund, Dicke: 12 μm PET, 2 μm PVDC, 80 μm PE-LD (ehemalige Fa. PKL)

Für die Bestimmung der mikrobiologischen Entkeimungseffizienz wurden als Trägermaterialien quadratische Folien mit einer Fläche von 6x6 cm² aus dem Kunststoff PET verwendet.

3.4.2 Prüfverfahren zur Bestimmung von Kunststoffeigenschaften

3.4.2.1 Siegelnahtfestigkeit

Grundlage dieser Methode ist eine elektromechanische Zugprüfmaschine. Mit dieser Apparatur wird bei einer Abzugsgeschwindigkeit von 100 mm/min und einem Abzugswinkel von 90°C die Kraft bestimmt, welche notwendig ist, eine 15 mm breite Siegelnaht eines eingespannten Probestreifens auseinander zu ziehen. Die Einheit dieser Messgröße ist demzufolge N/15 mm [ILV-Merkblatt 33, 1978]. Für die Bestimmung der geeigneten Siegelbedingungen für das untersuchte Material erfolgten Vorversuche mit glatten Siegelbacken. Folgende Einstellungen wurden als optimal befunden: Temperatur 120 °C, Druck 5 bar und Dauer 0,5 s. Dabei zeichnet sich eine "optimale" Naht dadurch aus, dass die Nahtfestigkeit größer ist als die Materialfestigkeit, das heißt, dass die Folie bei Zugversuchen eher reißt als sich die Siegelnaht löst.

3.4.2.2 Reibungszahl

Die Messung der Reibungszahl erfolgte nach DIN 53375 mit einer elektromechanischen Zugprüfanlage bei einer Abzugsgeschwindigkeit von 100 mm/min auf geschliffenem Werkzeugstahl als Reibklotz. Das Prüfgerät besteht aus einem Antriebsmechanismus zur Erzeugung einer gleichmäßigen Relativbewegung der Oberflächen gegeneinander und einer Kraftmesseinrichtung zur Registrierung der Reibungskräfte. Die Normalkraft resultiert aus der Gewichtskraft des Reibeklotzes, der auf der Probe aufliegt (200 g \square 1,962 N). Der Quotient aus Zugkraft F_D und Normalkraft F_N entspricht der dimensionslosen Reibungszahl μ_D (Gleitreibung), welche bei Kunststoffen überwiegend im Bereich von 0,2 bis 1 liegt [DIN 53375, 1986].

$$\mu_{\rm D} = F_{\rm D} / F_{\rm N} \tag{G1. 30}$$

3.4.2.3 Oberflächenenergie

Die Bestimmung der Oberflächenenergie der Kunststoffproben erfolgte nach DIN 53364 mit einem Schnellverfahren. Dabei wird die Oberfläche der Probenfolie mit verschiedenen Flüssigkeiten (Testtinten) von definiert abgestufter Oberflächenenergie linienförmig bestrichen und festgestellt, durch welche Flüssigkeit die Folie gerade noch benetzbar ist. Die Flüssigkeit mit der nächst höheren Oberflächenenergie benetzt dann nicht mehr die Folie. Praktisch werden dabei die Strich-Ränder der Flüssigkeitslinien auf "Zusammenziehen" beobachtet. Bleibt ein Strich mindestens zwei Sekunden ausgebreitet, wird die Testtinte mit nächst höherer Oberflächenenergie verwendet. Bei den Prüfflüssigkeiten handelt es sich meistens um Ethanol-Wasser- oder Formamid-Ethylglykol-Gemische [DIN 53364, 1986]. In dieser Arbeit wurden Testtinten der Fa. Plasmatreat eingesetzt, die eine relative Aussage in einem Messbereich von 28-72 mN/m ermöglichen. Gemessen wurden von jedem Kunststoff fünf Parallelproben mit einer Abmessung von 10x10 cm².

3.4.2.4 Sauerstoffdurchlässigkeit

Dieses Verfahren misst die Menge an Sauerstoff, die je Fläche, Zeit und Sauerstoffpartialdruck durch die Probe hindurchtritt - also die flächenbezogene Sauerstoffdurchlässigkeit [DIN 53380-3, 1998]. Das Messprinzip dieser Methode ist in Abbildung 28 dargestellt. Dabei wird die zu messende Folie zwischen beide Teile einer Permeationskammer gasdicht eingespannt. Durch einen Kammerteil strömt langsam Sauerstoff (10 ml/min), durch den anderen ein Trägergas (10 ml/min). Der durch die Folie permeierte Sauerstoff wird durch das Trägergas (Stickstoff + 3% Wasserstoff) erfasst und zu einem elektrochemischen Sensor transportiert, in dem ein elektrisches Signal entsteht, das proportional zum Sauerstoff-Mengenstrom ist [DIN 53380-3, 1998]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit beide Gase vor Eintritt in die Permeationskammer individuell zu befeuchten und dadurch die feuchtigkeitsabhängige Gasdurchlässigkeit von Kunststofffolien zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gasströme auf 50% relative Feuchte bei 23°C eingestellt.



Abbildung 28: Vorrichtung zur Bestimmung der Sauerstoffdurchlässigkeit nach DIN 53380-3.

3.4.2.5 Durchstoßfestigkeit

Dieses Prüfverfahren nach DIN 53373 dient zur Beurteilung des Verhaltens von Folien bei Stoßbeanspruchungen senkrecht zur Oberfläche und ermöglicht es, das Arbeitsaufnahmevermögen, die Durchstoßkraft und die Verformbarkeit miteinander zu vergleichen. Die Messeinrichtung besteht im Wesentlichen aus einer Einspannvorrichtung, aus einem Durchstoßkörper und Messgeräten zur Kraft- und Wegmessung. Dabei trifft die eingespannte Probenfolie mit einer definierten Geschwindigkeit (4,5 m/s) auf den Durchstoßkörper, der mittels einer Messzelle die ausgeübte Kraft und die Verformung misst. Ermittelt werden die folgenden Kenngrößen: die Schädigungsarbeit W_s , die Schädigungskraft F_s und die Schädigungsverformung I_s . Die Schädigungskraft F_s bezeichnet man die vom Durchstoßkörper auf die Probe ausgeübte Kraft im Schädigungspunkt. Die Schädigungsverformung I_s wird ebenfalls am Schädigungspunkt bestimmt [DIN 53373, 1970]. Der Verlauf der Messung wird als Kraft-Verformungs-Kurve dargestellt, woraus sich die genannten Messgrößen ableiten lassen (Abb. 29).


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Kraft-Verformungs-Kurve [DIN 53373, 1970].

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Experimente zur mikrobiologischen Entkeimungseffizienz der KDBE

Das vorliegende Kapitel beschreibt und bewertet die Untersuchungen zur mikrobiologischen Entkeimungseffizienz der KDBE gegenüber ausgewählten Testkeimen. Im Rahmen dieser Studien wurden verschiedene bakterielle Endosporen, Mikroorganismenzellen und Schimmelpilzsporen dem Plasma ausgesetzt, eine grundlegende Betrachtung zum Phänomen "Tailing" durchgeführt, und der Einfluss verschiedener Prozessgase untersucht.

4.1.1 Einfluss des Prozessgases auf die Entkeimung

Am Fraunhofer ILT erfolgte eine Versuchsreihe mit variierenden Prozessgasen in einer kaskadierten Barrierenentladung mit integrierten 282 nm Excimer-Strahler, also einem vergleichbarem Versuchsaufbau wie in dieser Arbeit verwendet. Als Versuchsgase dienten Stickstoff, Argon, Sauerstoff, synthetische Luft und Umgebungsluft (ca. 20°C, 50% \pm 5% r.F.). Zu Beginn wurden Abtötungskinetiken über der applizierten Dosis für den Testkeim *B. atrophaeus* erstellt (Abb. 30). Im Rahmen des Screenings unterschiedlicher Gase wurde jeweils nur eine Probe untersucht, wodurch die Lage der einzelnen Messwerte statistisch nicht gesichert ist (s. Kap. 3.2.3.2).

Die Darstellung der Keimreduktion in Abhängigkeit von der Dosis ist aus physikalischer bzw. energetischer Sicht sicherlich sinnvoll und hat ihre Berechtigung. Da allerdings für die industrielle Anwendung primär der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle spielt, werden nachfolgend die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Behandlungszeit unter Angabe der eingekoppelten Leistung dargestellt (Abb. 30/Tab. 10, S.179).

Bei Betrachtung der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer lässt sich ein zweiphasiger Abtötungsverlauf oder auch Tailing feststellen. Dabei zeigen sich eine schnelle Reduktion zu Beginn und eine deutlich verlangsamte Inaktivierung



im weiteren Verlauf. Eine genauere Betrachtung der Ursachen für das Tailing erfolgt in Kapitel 4.1.2.

Abbildung 30: Einfluss verschiedener Prozessgase auf die Entkeimung von *B. atrophaeus*-Endosporen auf PET-Folien, in Abhängigkeit von der Dosis respektive Behandlungszeit (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 200 W).

Für die Bewertung des Gaseinflusses auf die Entkeimungseffizienz der KDBE wurden die Anfangsteigungen für den ersten bzw. steilen Abschnitt des Abtötungsverlaufs bis zur ersten Sekunde betrachtet und die D-Werte ermittelt (Abb. 31). D-Werte ergeben sich aus den Kehrwerten der Geradensteigungen und sind ein mikrobiologisches Maß, welches das Abtötungsverhalten von Mikroorganismen charakterisiert. Bei Umgebungsluft und Argon wurden die Messpunkte bei 0,9 s nicht berücksichtigt, da diese Werte bereits in der zweiten Phase bzw. im abgeflachten Abtötungsverlauf liegen. Somit handelt es sich bei den beiden Gasen um Mindestwerte für Vergleichszwecke, da nur zwei Messpunkte (0 s und 0,6 s) für die Bestimmung herangezogen wurden. Tatsächlich könnte die Inaktivierung schneller erfolgen, allerdings wurden Zeiten unter 0,6 s nicht untersucht.



Abbildung 31: Anfänglicher Abtötungsverlauf für die Inaktivierung der Endosporen von B. atrophaeus, unter Verwendung verschiedener Prozessgase (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 200 W). Die angegebenen D-Werte wurden rechnerisch ermittelt und ergeben sich aus dem Kehrwert der jeweiligen Steigung.

Ein Vergleich der ermittelten D-Werte für die getesteten Prozessgase offenbart, dass vor allem die herkömmliche Umgebungsluft ($D_L = 0,13$ s) und Argon ($D_{Ar} = 0,15$ s) eine besonders schnelle Abtötung der *B. atrophaeus*-Endosporen ermöglichen. Langsamer erfolgt hingegen die Abtötung unter Verwendung von Sauerstoff ($D_{O2} =$ 0,26 s). Der Unterschied zwischen Umgebungsluft und Sauerstoff beträgt etwa 2,3 Zehnerpotenzen nach 0,6 Sekunden (Abb. 32). Als mögliche Ursache hierfür ist die geringe UV-Emission der Sauerstoffplasmen denkbar. Bei Luft als Prozessgas liegt eine Kombination aus energiereicher Strahlung durch angeregte Stickstoffmoleküle und reaktiver Sauerstoffspezies vor (s. Kap. 2.2.4.3). Denkbare Gründe für die Abweichung zwischen Umgebungsluft ($D_L = 0,13$ s) und synthetische Luft ($D_{SL} =$ 0,21 s) könnte der vorhandene Wasserdampf in der Umgebungsluft sein.

Einen erheblichen Wirkanteil in diesem Aufbau ist sicherlich der UV-Emission durch den Excimer-Strahler zuzuschreiben, die das direkte Plasma im Entladungsspalt synergistisch unterstützt und die hohe UV-Effizienz der KDBE bedingt (Abb. 32). Aus biologischer Sichtweise entspricht das Emissionsmaximum bei 282 nm dem Absorptionsmaximum der Proteine. Auch die DNS absorbiert bei 280 nm Strahlung (Abb. 18, S. 55). Darüber hinaus ist der Testkeim *B. atrophaeus* nicht übermäßig resistent gegenüber UV-Strahlung.



Abbildung 32: UV-Emissionsspektrum der kaskadierten Barrierenentladung mit integriertem 282 nm Excimer-Flachstrahler und Luft als Prozessgas, bei ca. 50 W und 170 W Leistung. Das Spektrum zeigt deutlich das Emissionsmaximum bei 282 nm, welches bereits außerhalb des Messbereichs liegt. Bei den weiteren Peaks kann es sich um Verunreinigungen im Strahler handeln (z.B. Sauerstoff).

Um den Effekt des Prozessgases auf die Entkeimungseffizienz im Entladungsspalt der KDBE besser herauszustellen, wurde ein Wiederholungsversuch mit den UVresistenteren Konidiosporen von *A. niger* durchgeführt, da beim kaskadierten Aufbau der Excimer-Strahler bei Normalbetrieb nicht abgeschaltet werden kann. Abb. 33 zeigt die Abtötungskinetiken für *A. niger* bei verschiedenen Prozessgasen in der KDBE. Mit Ausnahme von Argon und Umgebungsluft, zeigte sich bei den getesteten Prozessgasen insgesamt eine erheblich langsamere Inaktivierung der Konidiosporen von *A. niger* (Tab. 11, S. 179).



Abbildung 33: Abtötungskinetiken von *A. niger*-Konidiosporen (DSM 1957) auf PET-Folien, bei verschiedenen Prozessgasen und in Abhängigkeit von der Behandlungszeit (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 200 W).

Für Vergleiche wurden wieder die Anfangsteigungen der verschiedenen Prozessgase bis zur ersten Sekunde betrachtet und daraus die D-Werte abgeleitet (Abb. 34). Auch hier wurde für Umgebungsluft nur ein D-Wert aus lediglich zwei Messpunkten ermittelt, d.h. die Abtötung könnte tatsächlich schneller erfolgen. Dabei wird deutlich, dass sowohl Umgebungsluft ($D_L = 0,12$ s) als auch Argon ($D_{Ar} = 0,22$ s) sehr effizient in der Abtötung von A. niger-Konidiosporen sind. Eine Erklärung dafür können wiederum die optischen Spektren der untersuchten Gase liefern (S. 51-53). Wie bei der DBE gemessen, kann Argon besonders effizient Strahlung sowohl im VUV-Bereich (Ar* Excimer) mit Wellenlängen um die 126 nm, als auch im UVA-Bereich emittieren (ArO^{*}-Excimer) [FRANKEN et al., 2003]. UVA-Strahlung liefert mit Sicherheit nur einen geringen Beitrag zur Abtötung der Konidiosporen, VUV-Strahlung hingegen ist besonders energiereich und kommt natürlicherweise nicht vor. Generell weist die VUV-Strahlung in Gasen nur eine geringe Eindringtiefe auf, da vorhandene Moleküle wie Sauerstoff die Strahlung absorbieren. In einer Argon-Atmosphäre ist die Eindringtiefe der VUV-Strahlung aber viel höher, da diese erst unterhalb von 106 nm der Selbstabsorption unterliegt [HEISE et al., 2004]. Darüber



hinaus entsteht in der Barrierenentladung die Strahlung durch die entstehenden Plasmafilamente unmittelbar über der Probe.

Abbildung 34: Anfänglicher Abtötungsverlauf für die Inaktivierung von *A. niger*-Konidiosporen unter Verwendung verschiedener Prozessgase (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 200 W). Die angegebenen D-Werte wurden rechnerisch ermittelt und ergaben sich aus dem Kehrwert der jeweiligen Steigung.

Die gute Wirkung von Umgebungsluft ist überraschend, da das Spektrum von synth. Luft in der DBE im Wesentlichen Stickstoffbanden im UVA-Bereich aufweist. Die Strahlung ist aber meist von geringerer Intensität als bei reinem Stickstoff, da ein gewisser Anteil bereits durch erzeugtes Ozon absorbiert wird. Allerdings entstehen im Entladungsspalt zusätzlich zur Strahlung reaktive Sauerstoffspezies, die bei der Inaktivierung der oxidationsempfindlichen Schimmelsporen eine Rolle spielen könnten. Bei diesem Experiment zeigte sich aber auch eine deutliche Diskrepanz zwischen Umgebungsluft (D_L = 0,12 s) und synthetischer Luft (D_{SL} = 1,5 s), die sich in einer um etwa Faktor 10 erhöhten Reduktionszeit auf Seiten der synthetischen Luft äußerte.

Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die bereits erwähnte abweichende Zusammensetzung der Umgebungsluft mit einem gewissen Anteil an Wasserdampf (ca. 20°C, 50%±5% r.F.) liefern, welche in der synthetischen Luft nicht vorhanden sind. Diese beiden Aspekte und deren Einfluss auf die Entkeimung werden im Laufe dieser Arbeit noch näher untersucht (s. Kap. 4.2.1). Die Gasentladung mit Stickstoff hat eine überaus langsame Keimreduktion ergeben.

Basierend auf den ermittelten Daten wurden die weiteren Entkeimungsversuche mit Umgebungsluft durchgeführt, da dieses Gas die beste mikrobiologische Effizienz gezeigt hat und wirtschaftlich betrachtet die günstigste Variante darstellt.

4.1.2 Analyse des Tailings

Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben gibt es unterschiedliche Ursachen und Betrachtungsweisen für Abweichungen des Kurvenverlaufs von der Reaktion erster Ordnung. Das vitalistische Konzept basiert zum Beispiel auf der Annahme einer Resistenzverteilung innerhalb der Mikroorganismenpopulation. In der vorliegenden Arbeit wurden entsprechend des mechanistischen Konzepts einige methodische Aspekte als Ursache für das Tailing untersucht.

Da es sich bei der kaskadierten Barrierenentladung generell um ein Oberflächenverfahren handelt und durch die PET-Kunststofffolie keine entkeimende Wirkung nachgewiesen werden konnte, dürften prozessbedingte Kontaminationen auf der Probenunterseite eine Behandlung überleben und somit einen Beitrag zum Tailing leisten. Durchgeführte Untersuchungen zur Bestimmung der Restverkeimung auf den unterschiedlichen Folienseiten haben ergeben, dass sich der Hauptanteil der nachgewiesenen überlebenden Keime auf der Rückseite befindet (Abb. 35).

Eine derartige ungewollte Verkeimung ist häufig prozessbedingt und kann z.B. bei der Sprühkontamination oder dem Handling der Proben entstehen. Dabei ist vorstellbar, dass durch den feinen Sprühnebel immer ein bestimmter Anteil der Keime auf die Rückseite gelangt und damit für das Plasma unerreichbar bleibt. Für die Vermeidung einer solchen unerwünschten Verkeimung ist ein hoher verfahrenstechnischer Aufwand erforderlich. Auch beim Transport der Proben zu externen Forschungsstellen, zum Zwecke der Plasmabehandlung, besteht immer eine gewisse Wahrscheinlichkeit der Kontamination.



Abbildung 35: Lokale Verteilung der überlebenden Endosporen von *B. atrophaeus* bei getrennter Betrachtung der verschiedenen Folienseiten (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 130 W, Prozessgas: Luft) [MURANYi, 2003].

Aus diesen Gründen wurde der KDBE-Laborreaktor so konzipiert, dass er in eine herkömmliche Sterilbank eingebracht werden kann, wodurch das Arbeiten in steriler Umgebung ermöglicht wird. Für den Nachweis der überlebenden Keime wurde die bisherige Methodik modifiziert. Anstatt die vermehrungsfähigen Restkeime von der Oberfläche abzuschwemmen, wurde lediglich die plasmabehandelte Fläche der Folie mit Nährboden eingegossen und nach einer Inkubation wurden die Kolonien direkt auf der behandelten Seite bestimmt. Im Gegensatz zum Abschwemmverfahren, bei dem die komplette Probe in eine Spülflüssigkeit gebracht wird, lassen sich so nur die Keime erfassen, die tatsächlich dem Plasma ausgesetzt waren. Zusätzlich ist es möglich, eine Ortsauflösung überlebender Zellen durchzuführen, was in manchen Fällen eine Ursachenanalyse ermöglicht (z.B. Kratzer oder Vertiefungen in der Oberfläche). Aus Gründen der Genauigkeit eignet sich diese Methode allerdings nur für Mikroorganismen, die nicht schwärmen oder flächig wachsen. Bei Schimmelpilzen wie zum Beispiel A. niger empfiehlt sich das Abschwemmverfahren, da bereits wenige Pilzkolonien auf einem kleinen Areal die Auswertung erschweren können. Auch die unbehandelten Referenzproben mit hohen Keimdichten von mehreren Millionen Zellen pro Flächeneinheit können durch das Eingießverfahren nicht ausgewertet werden. Hier wirkt sich aber eine vorhandene Rückseitenverkeimung nicht negativ auf die Keimzahlbestimmung aus, da durch die hohe Keimdichte auf der Oberseite geringere Keimzahlen auf der Rückseite nicht ins Gewicht fallen. Erst bei wenig überlebenden Zellen werden Kontaminationen relevant.

Das Verfahren mit den eingegossenen Folienoberflächen führte zu einem deutlich niedrigeren Tailing (Abb. 36) und teilweise konnten auch sterile Oberflächen nachgewiesen werden. Damit haben diese Untersuchungen gezeigt, dass es sich bei der Plateaubildung um überlebende Keime auf der unbehandelten Fläche der Rückseite handeln kann. Die weiteren Ergebnisse in dieser Arbeit basieren größtenteils auf dem Eingießverfahren.



Abbildung 36: Einfluss der Nachweismethode auf das Tailing bei der Entkeimung von *B. atrophaeus* (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 130 W, Prozessgas: Luft) [MURANYI, 2003].

Neben der Kontamination unbehandelter Teilflächen wirkt sich auch eine hohe Belegungsdichte auf das Tailing aus. Dies geschieht durch die Ausbildung von Mehrfachschichten (Multilayern) und Agglomeraten, wobei sich die Keime bzw. Sporen durch Überlagerung gegenseitig schützen können. Auch bei der Sprühverkeimung, welche eine flächige und homogene Verkeimung von Oberflächen ermöglicht, kann es bei hohen Belegungsdichten zu lokalen Zellanhäufungen kommen. Eigene Arbeiten mit variierender Keimzahl bei konstanter Behandlungs-fläche haben den Einfluss der Keimdichte auf die Plateaubildung sowohl beim Abschwemm- (Abb. 37) als auch beim Eingießverfahren (Abb. 39) nachgewiesen [MURANYI, 2003].



Abbildung 37: Einfluss der initialen Keimdichte auf die Entkeimungseffizienz bei *B. atrophaeus* auf PET Folien, unter Anwendung des Abschwemmverfahrens (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Luft, Leistung: ca. 130 W) [MURANYI, 2003].

Dabei führte eine Erhöhung der Ausgangskeimdichte zu einer Anhebung des Plateaus, da die Anzahl der überlagerten Zellen ansteigt. Im Bereich der analysierten Keimdichten wirkte sich dies scheinbar nicht negativ auf die erzielte Abtötungsrate aus. Bei jeder untersuchten Keimdichte konnte eine Abtötung von fünf Zehnerpotenzen in einer Sekunde erreicht werden, womit der Anteil der Überlagerung theoretisch 1:100000 ist.

HEISE [2005] konnte bei einer Simulation der zufälligen Keimverteilung durch Sprühverfahren eine lineare Abhängigkeit zwischen der Keimdichte und dem relativen Keimanteil in sich überlagernden Schichten beobachten (bei doppelt logarithmischer Auftragung der Werte). Für einen bestimmten Bereich der Keimdichte (1 bis ca. 30 KbE/mm²) lagen nur Keime in der ersten Schicht vor, das heißt dass eine Zelle entweder gar nicht oder nur von höchstens einer anderen Zelle überlagert war. In diesem Bereich steigt das Tailing gleichmäßig mit der Keimdichte, d.h. die Abtötung bleibt konstant. Erst höhere Keimdichten führten zu einem Auftreten von Mehrfachüberlagerungen (> 2 KbE übereinander), mit einem stärkeren Anstieg als die Zunahme der Keime in der ersten Schicht [HEISE, 2005]. Dieses zunehmende Auftreten von Mehrfachüberlagerungen bei ansteigender Keimdichte kann letztendlich zu einer deutlichen Abnahme der Abtötungsrate führen. Vor allem bei Oberflächenverfahren mit begrenzter Eindringtiefe, wie der KDBE, können sich solche Mehrfachüberlagerungen negativ auf die Inaktivierungsrate auswirken. In der Praxis liegen die tatsächlichen Oberflächenkeimzahlen von Packstoffen aber sehr viel niedriger als die hohen Keimdichten wie sie bei Validierungen gefordert werden (z.B. 2 KbE/dm² bei PE-Folien / s. Tab. 1, S. 19), so dass nicht mit Zellüberlagerungen zu rechnen ist.

4.1.3 Mikrobiologische Entkeimungseffizienz der kaskadierten Barrierenentladung (KDBE)

Hauptziel dieser Untersuchungen war die Evaluierung der Entkeimungseffizienz der kaskadierten Barrierenentladung gegenüber verschiedenen Mikroorganismen auf PET-Folien. Aufgrund der diversen Wirkmechanismen im Gasplasma und im Hinblick auf die Erarbeitung geeigneter Testkeime für ein Validierungsverfahren, wurde das mikrobiologische Spektrum möglichst breit gewählt. Die Auswahl umfasste dabei unter anderem Sporenbildner mit besonderen Resistenzen sowie ausgesuchte pathogene Keime und Lebensmittelverderber mit Bezug zu industriellen Anwendungen im Nahrungs- und Genussmittelbereich.

4.1.3.1 Entkeimungseffizienz bei vegetativen Bakterien

Als Vertreter der vegetativen Bakterien wurden *Escherichia coli, Salmonella mons, Staphylococcus aureus* und *Deinococcus radiodurans* getestet. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, sowohl grampositive als auch gramnegative Keime zu verwenden, aufgrund der unterschiedlichen Zellwandstruktur, welche einen Einfluss auf die Resistenz der Bakterien gegenüber der Plasmabehandlung haben könnte. Die Behandlung erfolgte bei ungefähr 130 W eingekoppelter Leistung und mit Umgebungsluft als Prozessgas.

Nachfolgende Ergebnisse der Untersuchungen belegen, dass die KDBE in der Abtötung der vegetativen Zellen sehr effizient ist (Abb. 38). Zusätzlich zur grafischen Darstellung befinden sich im Anhang die entsprechenden Tabellen mit den Anfangs- und Endkeimzahlen sowie den Abtötungsraten (Tab. 12, S. 180).



Abbildung 38: Abtötungskurven und relative D-Werte ausgewählter vegetativer Keime bei einer Behandlung mit der kaskadierten Barrierenentladung, in Abhängigkeit von der Zeit (282 nm Excimer, Leistung: 130 W, Prozessgas: Umgebungsluft, Eingießverfahren).

Der Hauptanteil der Inaktivierung erfolgte innerhalb der ersten Sekunde, weshalb D-Werte für diesen Abschnitt ermittelt wurden. Wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, stellt der D-Wert auch in diesem Fall nur einen Mindestwert für Vergleichszwecke dar, da lediglich zwei Messpunkte verwendet wurden (0 und 1 s). Aufgrund der apparativen Gegebenheiten der KDBE können Behandlungszeiten unter einer Sekunde nicht realisiert werden. Die mit *Salm. mons* (> 6,7 Zehnerpotenzen), *D. radiodurans* (> 6,6 Zehnerpotenzen) und *Staph. aureus* (> 6,9 Zehnerpotenzen) beimpften Oberflächen zeigten nach einer Sekunde Behandlung kein Wachstum, d.h. die Keimzahl lag unterhalb der Nachweisgrenze von 0,33 KbE/Folie (3 Proben). Bei *E. coli* konnte im gleichen Zeitraum eine Reduktion der Keimzahl um 5,7 Zehnerpotenzen erreicht werden. Eine Verlängerung der Behandlungszeit auf drei Sekunden erhöhte die Abtötung auf 6,4 Zehnerpotenzen, wobei lediglich eine der drei Parallelproben eine Kolonie aufwies. Dabei kann es sich auch um eine methodisch bedingte Rekontamination handeln.

BAIER et al. [1992] haben bei Entkeimungsversuchen in einem Niederdruck-Argonplasma beobachtet, dass für die Inaktivierung von E. coli-Zellen um drei Zehnerpotenzen etwa neun Minuten erforderlich sind. Im Vergleich dazu kam es zu derselben Abtötung bei G. stearothermophilus in etwa acht Minuten. Daraus haben gefolgert, dass gramnegative Bakterien resistenter gegenüber sie der Plasmabehandlung sind als grampositive. Als Begründung nannten sie die zusätzlichen Zellwandproteine und die komplexe Struktur der gramnegativen Lipopolysaccharidschicht aus Polysacchariden und Phospholipiden [BAIER et al., 1992]. Allerdings lag die *E. coli*-Ausgangskonzentration $(9.4 \times 10^7 \text{ KbE/ml})$ bei BAIER et al. [1992] um fast zwei Zehnerpotenzen über der Konzentration von G. stearothermophilus (1,2x10⁶ KbE/ml) und die Inokulation der Probenträger erfolgte über das Eintauchen der Probenträger in Keimsuspensionen. Beides könnte Auswirkungen auf die Abtötungsgeschwindigkeit durch mögliche Überlagerungseffekte haben. Der Vergleich der Inaktivierungseffizienzen bei grampositiven und gramnegativen Zellen im Rahmen dieser Arbeit ergab eine marginal langsamere Abtötung bei E. coli, nicht aber bei Salm. mons, weshalb ein genereller Einfluss der gramnegativen Zellwandstruktur bei diesem Verfahren nicht nachgewiesen werden konnte. Bei Gegenüberstellung der D-Werte von E. coli mit etwa drei Minuten bei BAIER et al. [1992] und ca. 0,18 s bei der KDBE, wird die hohe Effizienz der kaskadierten Entladung deutlich.

4.1.3.2 Entkeimungseffizienz bei bakteriellen Endosporen

Aufgrund ihrer hohen Widerstandsfähigkeit gegenüber diversen physikalischen und chemischen Entkeimungsagenzien wurden Endosporen von *Bacillus*- und *Clostridium*-Spezies als Modellorganismen ausgewählt.

Bei *Cl. botulinum* konnte eine Reduktion auf 0,33 KbE/Folie innerhalb einer Sekunde und kein Wachstum nach bereits drei Sekunden erzielt werden. Daraus ergibt sich eine Abtötungsrate von mindestens 6,1 Zehnerpotenzen in einer Sekunde (Abb. 39, Tab. 13. S. 180). Auf Grundlage dieser Abtötungsrate wäre das 12-D-Konzept theoretisch nach zwei Sekunden erfüllt. Im Weiteren ließ sich bei *B. atrophaeus* eine Inaktivierung der Endosporen um 5,1 Zehnerpotenzen, bei *B. pumilus* um 5,5 Zehnerpotenzen und bei *Cl. sporogenes* um 5,3 Zehnerpotenzen innerhalb einer Sekunde mit der KDBE erlangen. Damit weisen diese drei Teststämme scheinbar eine etwas höhere Resistenz als *Cl. botulinum* auf, von bis zu einer Zehnerpotenz bei *B. atrophaeus* nach einer Sekunde.



Abbildung 39: Abtötungsverhalten ausgewählter Endosporen bei einer Behandlung mit der kaskadierten Barrierenentladung, in Abhängigkeit von der Zeit (282 nm Excimer, Leistung: 130 W, Prozessgas: Luft, Eingießverfahren).

Um den Einfluss der unterschiedlichen Ausgangskeimdichten zu berücksichtigen, wurde für den Vergleich der Inaktivierungsverläufe die logarithmische Auftragung N/N_0 über der Zeit gewählt, bei der die Messwerte auf die jeweiligen Ausgangskeimzahlen bezogen werden (Abb. 40).



Abbildung 40: Vergleich der Abtötungsverläufe verschiedener Endosporen durch logarithmische Auftragung von N/N₀ über der Behandlungszeit (282 nm Excimer, Leistung: 130 W, Prozessgas: Luft, Eingießverfahren).

In diesem Fall wurden auch D-Werte für den ersten Abschnitt der Abtötungskurve bestimmt, bei denen es sich lediglich um Mindestwerte handelt, da die Abtötung tatsächlich schneller erfolgen könnte. Allerdings bleibt hier der mögliche Einfluss einer höheren initialen Keimdichte auf die Abtötungsrate infolge von Zellüberlagerungen unberücksichtigt. Die Gegenüberstellung der Abtötungskinetiken der untersuchten Modellorganismen auf Grundlage von N/N₀ zeigt auf, dass die Endosporen von *B. atrophaeus* (D = 0,20 s) die höchste Resistenz besitzen und die von *Cl. botulinum* (D = 0,17 s) am schnellsten mit der KDBE zu inaktiveren sind. Ein Vergleich der erzielten Ergebnisse bei den Endosporen mit denen der vegetativen Zellen basierend auf den relativen D-Werten offenbart, dass die Abtötungsraten von *E. coli* (D = 0,18 s), *B. atrophaeus* (D = 0,19 s), *B. pumilus* (D = 0,18 s) und *Cl.*

sporogenes (D = 0,20 s) sehr ähnlich sind und sich diese Teststämme insgesamt langsamer inaktivieren lassen als die übrigen Modellorganismen. Im Abtötungsverlauf zeigte sich dies durch eine geringere Keimreduktion von bis zu einer Zehnerpotenz nach einer Sekunde. Aufgrund des strukturellen Aufbaus und der damit verbundenen Widerstandsfähigkeit, war eine höhere Resistenz bei den bakteriellen Endosporen zu erwarten.

Alle Endosporen, mit Ausnahme von *Cl. botulinum*, wiesen bei längeren Behandlungszeiten (drei Sekunden) eine deutlich verlangsamte Inaktivierung auf, was sich grafisch als Abflachung oder zweiphasiger Abtötungsverlauf widerspiegelte und unter "Tailing" bekannt ist. Die Ursachen für ein Tailing können vielseitig sein und wurden bereits in Kapitel 2.1.1 dargestellt. Im vorliegenden Fall wird eine Rekontamination der Substrate über die Luft ausgeschlossen, da der Versuchsreaktor vollständig in eine Sterilbank integriert wurde und die Zahl der überlebenden Keime bei *B. atrophaeus* mit durchschnittlich $3,6x10^1$ KbE/Folie relativ hoch lag. Auch eine Rekontamination durch Mikroorganismen auf unbehandelten Teilflächen kann vernachlässigt werden, da lediglich die behandelten Oberflächen mit Nährboden eingegossen und so für die Auswertung erfasst wurden.

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 näher erläutert, wird als Ursache für das Tailing die hohe Keimdichte auf dem Substrat in Betracht gezogen und die damit verbundene Schutzwirkung durch Überlagerung von Zellen. Eine hohe Keimdichte führt zu Mehrfachschichten und kann die oberflächenbasierte Wirkung der KDBE aufgrund der limitierten Eindringtiefe schwächen. Dies spiegelt sich in den unterschiedlichen Kinetiken wieder, da zufällig Variationen der initialen Keimzahl auftraten und diese zu einem Anstieg des Plateaus mit zunehmender Ausgangskonzentration führten (Abb. 39). Eine weitere Erklärung könnte das vitalistische Konzept liefern, wenn man davon ausgeht, dass innerhalb einer Mikroorganismenpopulation eine Resistenzverteilung vorliegt. Die Zunahme der Ausgangskonzentration würde bei gleich bleibendem Anteil besonders resistenter Endosporen die Anzahl der überlebenden Keime erhöhen. Die von WARRINER et al. [2000] durchgeführten Entkeimungsversuche mit einem KrF-Excimer-Strahler und *B. subtilis*-Endosporen auf PE-Folien resultierten in ähnlichen Abtötungskurven. Nach einer anfänglich schnellen Inaktivierungsphase folgte ein Tailing. Der Einfluss der Keimdichte auf die

Keimreduktion zeigte sich bei der Erhöhung der Ausgangskonzentration von 10⁶ KbE/4 cm² auf 10⁷ KbE/4 cm². Als Ursache nannten WARRINER et al. [2000] ebenfalls die Ausbildung von zellulären Mehrfachschichten. Aber auch resistente Subpopulationen oder Kratzer bzw. Poren im Material wurden genannt, in denen sich Endosporen einbetten können und so vor der Behandlung geschützt sind [WARRINER et al., 2000].

4.1.3.3 Entkeimungseffizienz bei Konidiosporen von A. niger

Die Konidiosporen von *Aspergillus niger* besitzen eine ausgesprochen hohe Resistenz gegenüber ultraviolettem Licht und dienen deshalb als Bioindikatoren bei Entkeimungsverfahren die auf UV-Strahlung basieren. Als Ursache für diese Eigenschaft ist die schwarze Pigmentierung der Sporenhülle zu nennen, welche die Strahlung absorbiert, bevor essentielle Zellbestandteile geschädigt werden [CERNY, 1990]. Da davon ausgegangen wird, dass die UV-Strahlung einen erheblichen Anteil der Wirkung der kaskadierten Barrierenentladung ausmacht, ist es wichtig diesen Keim in die Experimente mit einzubeziehen.

Die Resultate der Abtötungsversuche zeigen, dass innerhalb einer Sekunde eine Inaktivierung der Konidiosporen um etwa drei Zehnerpotenzen erzielt werden konnte und eine Verlängerung der Behandlungszeit auf drei Sekunden die Reduktion lediglich auf knapp vier Zehnerpotenzen erhöhte (Abb. 41).

Mit einem D-Wert von 0,33 s während der ersten Sekunde erwies sich *A. niger* als resistentester Testkeim innerhalb des untersuchten mikrobiologischen Panels. Auch hier konnte ein Tailing bei Verlängerung der Behandlungszeit beobachtet werden. Allerdings spielen hier sicherlich auch überlebende Sporen auf der unbehandelten Rückseite eine Rolle, da sich die *A. niger* Proben für das Eingießverfahren nicht eignen. Aufgrund der morphologischen Eigenschaften von *A. niger* und der langsamen Abtötung lässt sich folgern, dass die UV-Strahlung einen dominanten Part in der kaskadierten Entladung darstellt. Mit *A. niger* und *B. atrophaeus* (dem Vertreter der bakteriellen Endosporen mit höchstem D-Wert) wurden Inaktivierungskinetiken mit längeren Behandlungszeiten bis zu sieben Sekunden



aufgenommen, um zu sehen, ob Sterilität bei gesteigerter Plasmadosis zu erreichen ist (Abb. 42).

Abbildung 41: Abtötungsverlauf der Konidiosporen von *A. niger* bei einer Behandlung mit der kaskadierten Barrierenentladung, in Abhängigkeit von der Zeit (282 nm Excimer, Leistung: 130 W, Prozessgas: Luft).



Abbildung 42: Inaktivierungskinetiken von *A. niger*-Konidiosporen und *B. atrophaeus*-Endosporen bei längeren Behandlungszeiten (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 130 W, Prozessgas: Luft).

Dabei zeigte sich, dass für eine Abtötung der *A. niger*-Konidiosporen um etwa fünf Zehnerpotenzen ungefähr die 5-fache Dosis appliziert werden muss wie bei den Endosporen von *B. atrophaeus*. In dem Zeitrahmen von sieben Sekunden konnte bei beiden Modellorganismen keine vollständige Abtötung erreicht werden. Eine mögliche Ursache dafür kann das Vorhandensein von Agglomeraten und die damit verbundene Schutzwirkung der Zellen durch gegenseitige Überlagerung sein.

Weiterhin wurden Experimente mit Konidiosporen von *A. niger* DSM 1988 durchgeführt. Grund dafür waren Hinweise aus der Wasserstoffperoxidtechnologie, dass dieser Schimmelpilz möglicherweise resistenter gegenüber Oxidationsprozessen ist als der Teststamm DSM 1957. Da das Ziel des mikrobiologischen Screenings darin besteht, möglichst resistente Modellorganismen aufzufinden, wurde dieser Keim in die Versuchsreihen mit aufgenommen. Für einen direkten Vergleich wurden Abtötungskinetiken mit Konidiosporen von *A. niger* DSM 1988 und DSM 1957 in der KDBE erstellt, bei etwa 180 W Leistung und mit Luft als Prozessgas. Die ermittelten Daten belegen, dass sich die Konidiosporen von *A. niger* DSM 1988 auch in der KDBE als besonders resistent erweisen (Abb. 43).



Abbildung 43: Vergleich der Abtötungskinetiken von A. niger DSM 1988 und A. niger DSM 1957 (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Luft).

Diese höhere Widerstandsfähigkeit äußerte sich in einer langsameren Abtötung im Vergleich zu A. niger DSM 1957. Nach sieben Sekunden Behandlungszeit betrug der Unterschied etwa zwei Zehnerpotenzen. Als Grund für die erhöhte Resistenz von A. niger DSM 1988 könnte der unterschiedliche strukturelle Aufbau in Betracht gezogen werden. Die Untersuchung der Konidiosporen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) führte die Unterschiede zwischen beiden Stämmen augenscheinlich auf (Abb. 44). Konidiosporen vom Stamm DSM 1957 besitzen eine vergleichsweise glatte Oberfläche, wohingegen die Sporen von DSM 1988 eine gezackte Hülle aufweisen. Möglicherweise ist eine dickere Sporenhülle, bedingt durch die zellulären Ausstülpungen, die Ursache für die höhere Resistenz der Konidiosporen. Diese Vermutung wird verstärkt durch den Verlauf der Inaktivierungskinetiken vom Schimmelpilz Rhizopus oryzae (ehemals Rh. nigricans), der eine ähnliche gezackte Sporenstruktur aufweist und dessen Resistenz mit der von A. niger DSM 1988 vergleichbar ist.

Auffallend ist der Inaktivierungsverlauf bei A. niger DSM 1957. Bei Betrachtung der D-Werte zeigt sich, dass der Stamm DSM 1957 zu Beginn eine schnelle Reduktion aufweist (D = 0.36 s) und dann in eine Phase der langsameren Abtötung übergeht (D= 3,33 s). Der gleiche zweiphasige Verlauf deutet sich in abgeschwächter Form auch bei A. niger DSM 1988 an, allerdings mit geringer Signifikanz. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine Sporensuspension mit einem gewissen Anteil an Konidiosporen geringerer Resistenz sein (z.B. nicht ausgereifte Sporen), welcher innerhalb der ersten Sekunde rasch inaktiviert wird. Die anschließende Reduktion der resistenteren Konidiosporen erfolgt langsamer. Einen solchen Knick im Abtötungsverlauf, entsprechend einer Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten, beschreibt auch KESSLER [1996] für Sporensuspension aus zwei unterschiedlich resistenten Stämmen. Angenommen, es handelt sich bei der Suspension von A. niger DSM 1957 um eine Mischung von Konidiosporen unterschiedlicher Resistenzen, dann würde diese Suspension Sporen enthalten, die resistenter sind als die von A. niger DSM 1988 (D = 2,54).

Basierend auf den ermittelten Daten bilden *A. niger* Konidiosporen eine Grundlage für Optimierungsvorhaben bei der KDBE mit dem Ziel der Leistungssteigerung.



 Der verderet 15,27 µm

Abbildung 44: REM-Aufnahmen der Konidiosporen von A. niger DSM 1957 (Bild A) und A. niger DSM 1988 (Bild B).

4.2 Experimente zur Optimierung der Entkeimungsleistung

In diesem Kapitel werden zwei Möglichkeiten zur Steigerung der mikrobiologischen Entkeimungsleistung, speziell für den Schimmelpilz *A. niger*, untersucht und diskutiert. Zum einen der Einfluss der relativen Feuchte des Prozessgases, als auch der Einsatz eines Excimer-Strahlers mit Emission im kurzwelligen VUV-Bereich.

4.2.1 Einfluss der Luftfeuchte auf die Inaktivierungseffizienz

Bei Verwendung von Plasmen gibt es eine Reihe von Faktoren welche die funktionellen Eigenschaften eines Plasmas nachhaltig verändern können (z.B. das Prozessgas oder der Druck). Jede Variation der Parameter führt zu einer Abwandlung der gesamten Plasmachemie, durch Beeinflussung der Konzentration an Ladungsträgern und reaktiven Radikalen sowie des Anteils an emittierter Strahlung. Der vorliegende Laborreaktor ermöglicht allerdings nur die Veränderung von zwei Größen, der applizierten Leistung und des Prozessgases. Grundlage aller bisherigen Versuche mit der kaskadierten Barrierenentladung war die maximal applizierbare Leistung, so dass eine weitere Erhöhung nicht in Frage kam. Von einem Austausch des Gases wurde abgesehen, da die anfänglich durchgeführten Versuche mit variierenden Gasen gezeigt haben, dass Luft im Vergleich sehr effizient bei der Abtötung von Schimmelpilzsporen ist (Abb. 33, S. 100). Deshalb wurde versucht die Abtötungseffizienz der KDBE bei Aspergillus niger DSM 1957 durch eine Variation der Luftfeuchte und der damit verbundenen Veränderung der Radikalchemie zu optimieren. Für die Experimente wurde synthetische Luft als Prozessgas verwendet. Mit der unterschiedlich befeuchteten synthetischen Luft wurden dann im Plasma Inaktivierungskinetiken mit Konidiosporen von Aspergillus niger DSM 1957 erstellt. Eine Änderung der eingestellten relativen Luftfeuchte im Plasmareaktor durch Aufheizvorgänge oder Gasvermischung mit der Umgebungsluft konnte nicht berücksichtigt werden. Um gleichzeitig einen möglichen Einfluss auf die bakterizide Wirkung zu verifizieren, wurde auch das Abtötungsverhalten von Bacillus subtilis DSM 4181-Endosporen bei den unterschiedlichen Gasfeuchten in der KDBE überprüft.

Im Vergleich zu normaler Luft sind Spurengase wie Argon oder CO₂ in synthetischer Luft nicht enthalten. Allerdings haben Versuche im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass ein Einfluss dieser Minorbestandteile auf die Abtötungseffizienz nicht messbar ist (Abb. 45). Dafür wurden vergleichende Inaktivierungskinetiken mit synthetischer Luft und Umgebungsluft derselben relativen Luftfeuchte von *B. atrophaeus* und *A. niger* DSM 1957 in der kaskadierten Barrierenentladung erstellt.



Abbildung 45: Untersuchungen zum Einfluss der Spurengase in Luft auf die Inaktivierung der Konidiosporen von *A. niger* DSM 1957 und der Endosporen von *B. atrophaeus* (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 170 W).

4.2.1.1 Inaktivierungsverhalten von A. niger DSM 1957-Konidiosporen bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten

Abbildung 46 zeigt die Abtötung der Konidiosporen von *A. niger* DSM 1957 in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und der relativen Luftfeuchte. Für einen Vergleich der verschiedenen Kinetiken wurde das arithmetische Mittel der überlebenden Endosporen N auf die mittlere Ausgangskeimzahl N₀ bezogen (Darstellung N/N_0) und logarithmisch aufgetragen. Aufgrund der ähnlichen Keimdichte jeder Probe ist dies aussagefähig, da sich dadurch etwaige Schutzwirkungen infolge von Zellüberlagerungen bei allen Proben gleich auswirken sollten.



Abbildung 46: Abtötungsverhalten von *A. niger* DSM 1957 in Abhängigkeit von der Luftfeuchte und der Behandlungszeit (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 170 W).

Die Ergebnisse zeigen eine bedeutsame Verbesserung der Abtötung von A. niger DSM 1957 mit zunehmender relativer Feuchte der synthetischen Luft. Dieser Effekt ist besonders deutlich bei längeren Behandlungszeiten zu beobachten. Bei Betrachtung der Kinetik bei sieben Sekunden zeigen sich offensichtliche Leistungssteigerungen beim Wechsel von 0 auf 10% und von 60 auf 70%. Höchste Inaktivierung mit 3,3 Zehnerpotenzen konnte bei 70% und sieben Sekunden erzielt werden - im Gegensatz zu einer Reduktion von lediglich 1,4 Zehnerpotenzen bei trockener Luft und gleicher Behandlungszeit (Tab. 14, S. 181). Damit konnte durch die Gaskonditionierung eine Verbesserung der Inaktivierung von A. niger DSM 1957 um etwa zwei Zehnerpotenzen realisiert werden. Auffallend ist die Abnahme der 80%. Abtötungseffizienz maximalen relativen Luftfeuchte bei der von Möglicherweise liegt ein Optimum der Keimreduktion bei einer Luftfeuchte von 70% vor. Im Vergleich zur trockenen synthetischen Luft lassen sich bei 70%

relativer Luftfeuchte mit zunehmender Behandlungsdauer größere Differenzen zwischen den Abtötungsraten beobachten, was möglicherweise auf eine Anreicherung toxischer Agenzien im Entladungsspalt oder eine Änderung des Emissionsspektrums (z.B. durch OH oder H_2) hinweist.

Zu Verifizierung wurde ein Wiederholungsversuch mit Konidiosporen von *A. niger* DSM 1957 und relative Feuchten von 0%, 65%, 70% und 75% durchgeführt. Hierbei handelte es sich aber um eine neue Sporenanzucht, so dass dieses Experiment aufgrund von möglichen Resistenzunterschieden nur relative Vergleiche ermöglicht.

Der Wiederholungsversuch zeigte ebenfalls eine Verbesserung der Abtötung durch Erhöhung der relativen Luftfeuchte im Vergleich zur trockenen synthetischen Luft (Tab. 15, S. 181). Auch hier wird der positive Effekt der Gaskonditionierung bei ansteigenden Behandlungszeiten zunehmend deutlicher (Abb. 47).



Abbildung 47: Abtötungskinetiken von *A. niger* DSM 1957-Konidiosporen bei relativer Luftfeuchten von 0%, 65%, 70% und 75% (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 170 W).

Bei 7 s und 70% relativer Luftfeuchte konnte die Inaktivierung der Konidiosporen um fast zwei Zehnerpotenzen gesteigert werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dem vorherigen Versuch. Wiederum zeigt sich hier eine Leistungssteigerung bei Wechsel von 65% auf 70% relativer Feuchte. Die Messwerte bei 75% relativer Feuchte entsprechen weitgehend den Werten bei 70% relativer Feuchte. Damit liegt möglicherweise das Optimum der Reduktion im Bereich zwischen 70% und 80% relativer Feuchte vor. Eine denkbare Erklärung für den positiven Effekt der gesteigerten Luftfeuchte auf die Inaktivierung von *A. niger* DSM 1957 ist die Spaltung der zusätzlichen Wassermoleküle durch Stoßprozesse mit geladenen Teilchen zu relativ langlebigen Hydroxylradikalen. Für die Dissoziation der O-H-Bindung in Wasser ist eine Energie von etwa 5,1 eV erforderlich.

$$H_2O + e^- \rightarrow OH \cdot + \cdot H + e^- \qquad (Gl. 31)$$

Dabei könnten längere Behandlungszeiten kurzfristig zu einer Anreicherung der Radikale im Entladungsspalt führen und dadurch die mikrobizide Wirkung exponentiell erhöhen. Diese Überlegung haben auch PUREVDORJ et al. [2003] in ihrer Arbeit beschrieben. Aufgrund ihrer hohen Elektronegativität sind Hydroxylradikale starke Oxidantien, welche die Integrität der Konidiosporen schädigen können. Da das Standard-elektrodenpotential von Hydroxylradikalen (+2,8 V) viel höher liegt als das von atomarem Sauerstoff (+2,42 V), Ozon (2,07 V) oder Wasserstoffperoxid (+1,77 V), ist eine Anreicherung dieser Spezies als biologisch kritischer einzuschätzen [TAMM, 2002]. Zwei Hydroxylradikale können aber auch chemisch zu Wasserstoffperoxid reagieren, einer Verbindung mit antimikrobieller Wirkung [PUREVDORJ et al., 2003]. Dabei beruht die mikrobizide Wirkung von Wasserstoffperoxid auf der Freisetzung von naszierendem Sauerstoff, der wesentliche Bestandteile der Zelle (z.B. Enzyme) schädigt [WALLHÄUBER, 1988].

$$2(OH) \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O + O \tag{Gl. 32}$$

Ein Einfluss der relativen Luftfeuchte auf die Konzentration an Hydroxylradikalen ist mit Sicherheit gegeben. Eine Anreicherung dieser kurzlebigen Spezies bei längeren Behandlungszeiten ist denkbar, aber von den radikal-chemischen Vorgängen im Entladungsspalt abhängig – vom Verhältnis der radikalerzeugenden Prozesse (Photodissoziation, Stoßprozesse) zur Abreaktionszeit der Radikale. FALKENSTEIN [1997a] gibt für die Existenzdauer von Hydroxylradikalen in einer DBE einen Wert von etwa 23 ns an. RAMSAY et al. [2000] berichten von Zeiten in der Größenordnung von kleiner 10 µs bei der Entkeimung mit Excimer-Strahlern.

Die zusätzlichen Wassermoleküle absorbieren aber auch die emittierte UV-Strahlung vom integrierten Excimer-Flachstrahler. Allerdings ist die Photonenenergie des 282 nm-Strahlers mit 4,4 eV nicht ausreichend, um Wassermoleküle zu dissoziieren. Ein wesentlicher Bildungsweg von OH-Radikalen in einer DBE ist nach FALKENSTEIN [1997b] die Reaktion von Wasser mit atomaren Singulett-Sauerstoff O (¹D) aus der Photodissoziation von Ozon. Die maximale Absorption von Ozon liegt bei 255 nm und damit in der sog. Hartley-Bande (244-278 nm). Damit trägt der 282 nm Strahler sicherlich über die Spaltung des Ozons (Bindungsenergie 3,9 eV) zur Erzeugung von Hydroxylradikalen bei.

WALLHÄUßER [1988] beschreibt bei der UV-Entkeimung allgemein, dass für den gleichen Abtötungseffekt bei trockener Luft etwa die zweifache Dosis erforderlich ist wie bei 72% relativer Luftfeuchte. Diese Feststellung deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen für die *A. niger* DSM 1957-Konidiosporen. Weiterhin berichtet WALLHÄUBER [1988] von einer Abnahme des Entkeimungseffektes bei sehr hohen relativen Luftfeuchten von über 80%, infolge reduzierter UV-Durchlässigkeit der Luft und Ausbildung schützender Wasserfilme um die Mikroorganismen. Die Untersuchungsergebnisse mit der KDBE zeigen ebenfalls eine schlechtere Abtötung von *A. niger* bei 80%iger relativer Luftfeuchte und stimmen mit dem erklärten Phänomen von WALLHÄUBER [1988] überein. Allerdings berichten ANSARI & DATTA [2003] von einer Eindringtiefe von bis zu 30 cm für UV-Strahlung in Wasser (keine Angabe der Wellenlänge). Da aber der Spalt der KDBE nur eine Höhe von 1 mm aufweist, sind die von WALLHÄUBER [1988] beschriebenen Effekte der eingeschränkten Durchlässigkeit und eines schützenden Wasserfilms sicherlich nicht signifikant.

FALKENSTEIN [1997b] hat das Verhalten der Mikronentladungen einer dielektrischen Barrierenentladung in Abhängigkeit der Luftfeuchte und unter Einwirkung von UV-Strahlung analysiert. Der diesen Untersuchungen zugrunde liegende Versuchsbau ähnelte im Wesentlichen der kaskadierten Entladung. Dabei wurde gezeigt, dass eine steigende Wasserkonzentration in der Luft zur verstärkten Hydroxylradikal-Produktion führt und damit die Oxidationsrate erhöht [FALKENSTEIN, 1997b].

Allgemein konnten FALKENSTEIN & COOGAN [1997] und FALKENSTEIN [1997b] in einer normalen DBE beobachten, dass eine erhöhte Luftfeuchte zu einer reduzierten Anzahl, aber dafür intensiveren Mikroentladungen führt. Als Ursache nennt FALKENSTEIN [1997b] die Anlagerung von Wasser an die Oberfläche des Dielektrikums mit einer damit verbundenen Abnahme des Oberflächenwiderstands. Gleichzeitig bedingt dieser Vorgang eine Abnahme der Plasmafilamente [FALKENSTEIN, 1997b; FALKENSTEIN & COOGAN, 1997].

Die im Fall der vorliegenden kaskadierten Entladung über den Excimer-Flachstrahler zusätzlich eingebrachte UV-Strahlung kompensiert die Abnahme und führt zur Bildung weiterer kleiner Mikroentladungen mit allerdings geringer Hydroxylradikal-Bildung. Da es sich aber um nichtlineare Effekte handelt, kommt es letztendlich zu einer verstärkten Erzeugung von Hydroxylradikalen [FALKENSTEIN, 1997a]. Nach FALKENSTEIN [1997a] kann sich die Luftfeuchte allerdings negativ auf die Verteilung der Filamente und damit auf die Behandlungshomogenität des Plasmas auswirken. Für die Bestätigung dieser Annahme sind weitere Versuche durchzuführen.

Sehr interessant in diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von MAEDA et [2003] über die Inaktivierung von Escherichia coli in al. einem Atmosphärendruckplasma mit relativen Luftfeuchten zwischen 0 und 70% bei 25°C. MAEDA et al. [2003] beobachteten für die Abtötung als Funktion der Luftfeuchte einen Kurvenverlauf, der einer Normalverteilung entspricht. Demnach lag keine Keimreduktion bei den Randwerten 0% und 70%, aber eine maximale Abtötung bei etwa 44% relativer Luftfeuchte vor [MAEDA et al., 2003]. Als Wirkmechanismus wurde hier ebenfalls die Bildung chemisch reaktiver Spezies aus den Wassermolekülen genannt - allerdings primär von Ozon. Eine Konzentrationsbestimmung konnte aber keine ausreichend hohen Ozonmengen nachweisen, so dass diese Annahme ausgeschlossen werden konnte. Bei den Versuchen von MAEDA et al. [2003] diente eine Zellkultur im flüssigen Zustand als Probe. Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Konzeption der Plasmaanlage und des Versuchsprinzips sind Rückschlüsse also nur bedingt möglich.

4.2.1.2 Inaktivierungsverhalten von *B. subtilis*-Endosporen bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten

Die Ergebnisse der Entkeimungsversuche bei variierender relativer Luftfeuchte für *B. subtilis* sind in der Abbildung 48 grafisch dargestellt.



Abbildung 48: Abtötungsverhalten von *B. subtilis* in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchte und der Behandlungszeit (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 170 W).

Die Kinetiken zeigen, dass sich die Abtötung von B. subtilis mit zunehmender Gasfeuchte verschlechtert. Dieser Effekt ist bei relativer der kurzen Behandlungsdauer von einer Sekunde besonders deutlich. Um den absoluten Einfluss der relativen Luftfeuchte besser abschätzen zu können, wurden die Werte bei der maximalen relativen Luftfeuchte von 80% und bei trockener synthetischer Luft miteinander verglichen. Tabelle 16 im Anhang (S. 182) zeigt die logarithmische Abtötung bei 0% und 80% relativer Luftfeuchte in Abhängigkeit der Behandlungsdauer.

Nach einer Behandlungsdauer von einer Sekunde konnte eine mittlere logarithmische Abtötung von 4,7 Zehnerpotenzen bei trockener Luft, aber lediglich 2,6 Zehnerpotenzen bei 80% relativer Luftfeuchte erzielt werden. Daraus lässt sich folgern, dass sich die Inaktivierung der *B. subtilis*-Endosporen mit zunehmender Luftfeuchte verschlechtert.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die von FALKENSTEIN [1997a] beschriebene Abnahme der Homogenität des Plasmas im Entladungsspalt bei zunehmender relativer Luftfeuchte liefern. Demnach führt die Dissoziation von Wassermolekülen im Entladungsspalt zu einer Erhöhung des Ladungsübertrages pro Filament und somit zur Abnahme der Anzahl an Mikroentladungen. Messungen von FRANKEN et al. [2003] an einer DBE belegen eine Abnahme der Entladungshomogenität bei hohen Luftfeuchten im Vergleich zu trockener Luft (Abb. 49).



Abbildung 49: Auswirkungen unterschiedlicher Prozessgase auf die Homogenität einer DBE [Franken et al., 2003].

Aufgrund der vergleichsweise hohen Resistenz von *B. subtilis*-Endosporen gegenüber Oxidationsreaktionen ist eine Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. Hydroxylradikalen) in dem Behandlungszeitraum von wenigen Sekunden sicherlich nicht als effektiv zu betrachten [REUTER, 1986]. Die Reduktion der Plasmafilamente bzw. eine inhomogene Verteilung hingegen, könnte sich negativ auf die Abtötung von *B. subtilis* auswirken. Eine Abschwächung der UV-Strahlung

durch absorbierende Wassermoleküle ist aufgrund der geringen Spalthöhe von etwa 1 mm sicherlich vernachlässigbar.

Da die UV-Strahlung einen wesentlichen Wirkmechanismus im Plasma darstellt, wurde nach Analogien im Bereich der UV-Entkeimung gesucht. HATCH [1949] berichtet ebenfalls von einem Zusammenhang zwischen Luftfeuchte und bakterizider Wirkung bei der UV-Entkeimung. Demnach konnte ein starker Abfall bei der UV-Entkeimung von *E. coli* und relativen Luftfeuchten von über 60% beobachtet werden (Abb. 50) [HATCH, 1949]. Ein solcher Effekt kann bei den vorliegenden Ergebnissen beobachtet werden, da auch hier eine leichte Abnahme der Abtötungseffizienz ab 40% relativer Luftfeuchte zu verzeichnen ist. Allerdings wurden keine plausiblen Erklärungen für diese Beobachtung geliefert. Auch CERNY [1977] konnte bei zunehmender relativer Luftfeuchte (30-90%) eine Erhöhung der Widerstandsfähigkeit von *Bacillus*-Sporen gegenüber UV-Strahlen nachweisen.



Abbildung 50: Einfluss der Luftfeuchte auf die UV-Inaktivierung von *E. coli* [HATCH, 1949].

Abweichende Ergebnisse bei der Inaktivierung von *Bacillus*-Subspezies haben PUREVDORJ et al. [2003] veröffentlicht. In Versuchen mit Endosporen von *Bacillus*

pumilus in einem Niederdruckplasma konnten sie durch Luftbefeuchtung eine Steigerung der Sporenabtötung um zwei Zehnerpotenzen erreichen [PUREVDORJ et al., 2003]. Eine Erklärung für diese gegenläufige Beobachtung könnten die intrinsischen Eigenschaften des Testkeims liefern. Die Spezies *B. subtilis* (speziell der hier eingesetzte Stamm DSM 4181) zeichnet sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Oxidationsvorgänge aus, weshalb die Endosporen auch bei der Wasserstoffperoxidtechnologie als Bioindikatoren Anwendung finden. Eine Erhöhung der Dichte an reaktiven Sauerstoffspezies würde sich bei diesem Testkeim also nicht unmittelbar auf die Abtötung auswirken. Bei anderen Spezies (z.B. *B. pumilus*) könnte dies zu einer gesteigerten Abtötung führen. Aufschluss darüber können nur weitergehende Untersuchungen mit anderen Testkeimen liefern. Da aber das primäre Ziel der Leistungssteigerung bei *A. niger* durch erhöhte Luftfeuchte erreicht werden konnte, wurde dieser Aspekt nicht weiter verfolgt.

4.2.2 Einfluss des Excimer-Strahlers auf die Entkeimungseffizienz

Als weitere Möglichkeit zur Optimierung der Entkeimungsleistung der KDBE wurde eine Variation des Excimer-Strahlers in Betracht gezogen. Durch Einbau eines Flachstrahlers mit Xenon-Füllung (Xe_2^*) sollte die Auswirkung extrem kurzwelliger Strahlung im Bereich von 172 nm auf die Mikroorganismen untersucht werden. Dabei handelt es sich um sehr energiereiche VUV-Strahlung, die natürlicherweise nicht vorkommt und damit besonders effizient bei der Inaktivierung der Mikroorganismen sein könnte. Mit einer Photonenenergie in der Größenordnung von etwa 7,2 eV ermöglicht diese Wellenlänge die Spaltung chemischer Bindungen mit Bindungsenergien von bis zu 700 kJ/mol. Diese Energie ist ausreichend, um die Oberfläche von Mikroorganismen anzugreifen und diese selbst zu inaktivieren. Parallel dazu wurden Abtötungskinetiken mit dem 282 nm Excimer (XeBr^{*}) angefertigt. Hier liegt die Photonenenergie bei etwa 4,4 eV. Der Vergleich beider Excimer-Strahler (Xe₂^{*}, XeBr^{*}) unter Verwendung der Endosporen von *B. atrophaeus* ergab keinen signifikanten Unterschied in der Inaktivierungseffizienz (Abb. 51).



Abbildung 51: Einfluss eines 172 nm und eines 282 nm Excimer-Strahlers auf die Inaktivierung der Endosporen von *B. atrophaeus* DSM 2277, bei kontinuierlicher Behandlungsweise (KDBE, Leistung: ca. 400 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Trotz der hohen Photonenenergie der Xe₂^{*}-Strahlung zeigte sich bei *B. atrophaeus* wider erwarten kein besserer Abtötungseffekt. Bei Betrachtung der Messpunkte am Ende der Kinetiken lässt sich eine Überlagerung der Werte feststellen. Die Steigung der Regressionsgerade belegt dem 172 nm-Strahler sogar eine etwas schlechtere Wirkung im Vergleich zum XeBr^{*}-Strahler mit Emissionsmaximum bei 282 nm.

Als Ursache für die mittelmäßige Wirkung kann eine Absorption der sehr kurzwelligen Strahlung von 172 nm durch Moleküle in der Luft (z.B. Ozon, Sauerstoff oder Wasser) in Betracht gezogen werden. Eine starke Absorption durch den molekularen Sauerstoffs erfolgt im Bereich der Schumann-Runge-Bande (175-195 nm) bzw. des -Kontinuums (100-175 nm) - also im Bereich des Emissionsmaxima des Strahlers - wobei durch Photodissoziation atomarer Sauerstoff im Singulett- (O(¹D)) und Triplett-Zustand (O(³P)) entsteht. Der sehr reaktive atomare Sauerstoff kann Mikroorganismen angreifen und bildet die Grundlage für die Bildung von Ozon und Hydroxylradikalen aus Wasser [FALKENSTEIN, 2001].

$$O(^{1}D) \text{ oder } O(^{3}P) + O_{2} + M \rightarrow O_{3} + M$$
 (Gl. 33)

$$O(^{1}D) + H_{2}O \rightarrow 2OH \cdot$$
 (Gl. 34)

Der Energieeintrag des 172 nm-Strahlers ist ebenfalls ausreichend, Wasser oder Ozon direkt zu dissoziieren. Nach AZARAGUE et al. [2005] nimmt die Absorption von Wasser im Bereich von 190-120 nm stetig zu und bei 172 nm liegt der Anteil an Hydroxylradikalen bei etwa 42%. Die Photonenenergie des XeBr*-Strahlers (282 nm) mit 4,4 eV nm reicht nicht aus, um Sauerstoff zu spalten (mind. 5,2 eV, s. S. 59), kann aber Ozon photolytisch in energetisch angeregte Sauerstoffatome (O(¹D)) zerlegen (mind. 3,9 eV), woraus durch Folgereaktionen Hydroxylradikale und weiteres Ozon entstehen können (siehe oben). Für eine direkte Dissoziation der OH-Bindung in Wasser sind etwa 5,1 eV erforderlich, womit die Emission des XeBr*-Strahlers nicht ausreichend ist. Durch den höheren Sauerstoffanteil im Luftplasma im Vergleich zu Ozon (ca. 1-5 Gew.-%), ist der Beitrag des Xe₂*-Excimer zur Radikalchemie größer.

Aufgrund der Oxidations-Resistenz von *B. atrophaeus*-Endosporen müssen diese Reaktionsprodukte die Inaktivierung nicht unbedingt beeinflussen. Wie bereits in Kapitel 4.2.1.2 diskutiert, ist bei diesem Testkeim sicherlich die UV-Strahlung ein wesentlicher Mechanismus für eine schnelle Inaktivierung. Da im Luftplasma mengenmäßig mehr Sauerstoff als Ozon vorhanden ist, kann von einer stärkeren Abschwächung des 172 nm-Strahlers ausgegangen werden als beim 282 nm-Strahler. Dies könnte die reduzierte Wirkung des 172 nm-Strahlers im Fall von *B. atrophaeus* erklären. Eine Intensitäts-Messung der auftreffenden Lichtemission wurde nicht vorgenommen.

Bei *A. niger* DSM 1957 hingegen zeigt sich eine schnellere Abtötungsreaktion bei Verwendung des Xe_2^* -Excimers mit 172 nm Emission (Abb. 52). So ist der 172 nm-Strahler mit einem D-Wert von 0,17 s schneller als der 282 nm Strahler mit 0,23 s. Bei Betrachtung der finalen Keimzahl nach einer Sekunde beträgt der Unterschied fast zwei Zehnerpotenzen. Auffällig sind der anfänglich gleiche Verlauf und der plötzliche Abfall der Keimzahl ab 0,3 s um mehrere Zehnerpotenzen. Da bei diesen Versuchsreihen nur Einzelproben untersucht wurden, kann es sich um "Ausreißer" handeln.



Abbildung 52: Einfluss eines 172 nm und eines 282 nm Excimer-Strahlers auf die Inaktivierung der Konidiosporen von *A. niger* DSM 1957, bei kontinuierlicher Behandlungsweise (KDBE, Leistung: ca. 400 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Die erhöhte Inaktivierung der Konidiosporen könnte auf eine gesteigerte Photodissoziation von Gasmolekülen wie Sauerstoff, Ozon oder Wasser zu besonders reaktiven Oxidationsmitteln zurückzuführen sein, die sich bei *B. atrophaeus* in dieser kurzen Zeit nicht auswirken. Aber auch Aufheizvorgänge in den Konidiosporen infolge der Absorption der energiereichen Strahlung durch die schwarz pigmentierte Sporenwand sind vorstellbar. Damit ist die kurzwelligere Strahlung effizienter in der Abtötung von *A. niger* DSM 1957.

Die Untersuchungen mit den Konidiosporen von *A. niger* DSM 1988 ergaben beim 172 nm-Strahler eine Reduktion von etwa 1,5 Zehnerpotenzen nach 0,1 s und anschließend eine langsamere Inaktivierung um weitere 1,5 Zehnerpotenzen in etwa 0,9 s (Abb. 53). Bei Betrachtung der Endwerte beider Strahler nach einer Sekunde, erweist sich der 172 nm Strahler um etwa eine Zehnerpotenz effizienter. Trotz einer niedrigeren Ausgangskeimdichte von einer Zehnerpotenz im Vergleich zu *A. niger* DSM 1957 konnte bei DSM 1988 lediglich eine absolute Abtötung von etwa drei Zehnerpotenzen in einer Sekunde mit dem 172 nm Strahler erreicht werden – die
Inaktivierung betrug bei *A. niger* DSM 1957 nahezu sechs Zehnerpotenzen. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits in Kapitel 4.1.3.3 erwähnte hohe Resistenz dieses Schimmelpilzes. Auffällig ist allerdings die recht große Streuung der Messergebnisse bei dem 282 nm-Strahler. Auch hier wurden nur Einzelproben untersucht. Dies hat zur Folge, dass sich Ausreißer (z.B. durch methodischen Fehler) nachteilig auf die Festlegung des Kurvenverlaufs und damit die Beurteilung der Inaktivierungskinetik auswirken.



Abbildung 53: Einfluss eines 172 nm und eines 282 nm Excimer-Strahlers auf die Inaktivierung der Konidiosporen von *A. niger* DSM 1988, bei kontinuierlicher Behandlungsweise (KDBE, Leistung: ca. 400 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

4.3 Experimente zu den Plasma-Wirkmechanismen

Mikroorganismen weisen einen komplexen Aufbau mit diversen chemischen Verbindungen und multifunktionalen Strukturen auf, die zum Teil eine hohe Widerstandsfähigkeit bedingen und auf diese Weise das Überleben in extremen Habitaten oder die Resistenz gegenüber entkeimenden Agenzien ermöglichen. Das nachfolgende Kapitel widmet sich dem Nachweis plasmainduzierter Schäden an wesentlichen Komponenten (z.B. Zellwand, DNS) bakterieller Zellen bzw. Sporen mit dem Ziel, etwaige Schadbilder möglichen Wirkmechanismen zuzuordnen. Eine Kenntnis dieser Daten ist essentiell für Optimierungsvorhaben.

4.3.1 Wirkung auf die Sporenhülle respektive bakterielle Zellwand

Um Schäden an der Sporenhülle zu untersuchen, wurden an der Ruhr-Universität Bochum (RUB) von plasmabehandelten Endosporen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abb. 54).

Für die Versuche wurden Endosporen von *B. atrophaeus* mittels Sprühverfahren homogen auf dünne Glasträger aufgebracht (1 cm²) und getrocknet. Die Behandlung erfolgte mit der KDBE bei folgenden Parametern: Luft als Prozessgas, eine Leistung von ca. 170 W und Behandlungszeiten von 0, 5, 10 und 30 s.

Nach 10 s konnte eine Strukturierung der glatten Oberfläche der Endosporen beobachtet werden. Dabei handelt es sich um einen Angriff der Oberfläche durch Radikale (Plasmaätzen) und Ionen, wobei die in der Plasmarandschicht beschleunigten Ionen einzelne Festkörperbindungen aufbrechen, welche dann durch einen großen Neutralteilchenfluss abgesättigt werden. Auf diese Weise kann die Bindung nicht mehr relaxieren und das Festkörperatom schrittweise aus dem Verbund herausgelöst werden [AWAKOWICZ, 2008]. Interessanterweise lässt sich diese Strukturierung bei den Proben mit 30 s Behandlung nicht mehr nachweisen. Möglicherweise wurde hier die äußere Schicht stärker abgetragen, wodurch wieder eine glattere Oberfläche zum Vorschein kam. Die äußerste begrenzende Schicht vegetativer Bakterien ist die Zellwand, die auch ein Bestandteil der Sporenstruktur darstellt und die mechanische Stabilität und Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen bestimmt. Damit stellt die Zellwand vegetativer Zellen ein primäres Angriffsziel für die Wirkmechanismen im Plasma dar. Vorstellbar ist, dass ein Teilchenbeschuss durch Ionen bzw. chemische Reaktionen zwischen reaktiven Spezies und Bestandteilen der Zellwand (Plasmaätzen) Schäden verursachen können, die für Mikroorganismen letal sind. Möglicherweise wird die Zellwand durch das Auftreffen von beschleunigten Elektronen und Ionen durchlöchert oder in ihren chemischen und



physikalischen Eigenschaften verändert. Die gezeigten REM-Aufnahmen der Endosporen deuten auf strukturelle Veränderungen der Oberfläche hin.

Abbildung 54: REM-Aufnahmen von unbehandelten *B. atrophaeus*-Endosporen und nach einer 10 s Behandlung mit der KDBE (unten) (282 nm-Strahler, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W).

Für den Nachweis einer möglichen Zellwandschädigung durch die kaskadierte Barrierenentladung wurden behandelte vegetative Zellen von *B. atrophaeus* mittels Gramfärbung untersucht. Diese Methode dient allgemein der taxonomischen Unterscheidung zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien aufgrund ihrer Zellwandstruktur. Das Prinzip beruht auf einer Anfärbung der Zellwand mit einem Kristallviolett-Jod-Komplex. Eine nachfolgende Behandlung mit Ethanol dehydriert die Zellwand und schließt den Farbstoff ein. Dies hat zur Folge dass eine Extraktion des Farbstoffkomplexes aus der Zelle nicht mehr möglich ist und die grampositive Zelle im mikroskopischen Bild blau erscheint. Gram-negative Zellen hingegen lassen sich aufgrund ihres abweichenden Zellwandaufbaus entfärben. Mögliche Modifikationen durch die kaskadierte Barrierenentladung könnten sich auf den Färbeprozess auswirken. Die Abbildung 55 gibt das Entfärbeverhalten der Zellen bei unterschiedlichen Behandlungszeiten wieder.



Abbildung 55: Zeitabhängige Veränderung des Gram-Färbeverhaltens vegetativer *B. atrophaeus*-Zellen bei Behandlung mit der KDBE (282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Blaufärbung der grampositiven Zellen mit zunehmender Behandlungszeit verringert. Während die Referenzen und die Proben mit einer Sekunde Behandlungszeit tiefblau gefärbt sind, lassen sich bereits ab 5 s deutlich aufgehellte Zellen erkennen. Dies könnte eine Folge von "Löchern" oder strukturellen Veränderungen in der Zellwand sein, die ein Auswaschen des Farbstoffkomplexes durch das Ethanol bewirken. Weiterhin lässt sich ein Schrumpfen der Zellen beobachten, welches möglicherweise auf einem Wasserverlust beruht. Denkbar wäre eine plasmainduzierte Schädigung bzw. Veränderung der Zelloberfläche, wodurch der Alkohol die Zelle besser dehydrieren kann.

4.3.2 Wirkung auf die DNS

Die DNS als Träger der Erbinformation ist essentiell für den dauerhaften Ablauf jeglichen Stoffwechsels in der Zelle. Schäden an diesem helikalen Makromolekül können aufgrund der komplexen chemischen Struktur vielfältig sein. Dazu gehören unter anderem Strangbrüche oder strukturelle Veränderungen wie Mutationen, die je nach Ausmaß eine Vermehrung der Zelle verhindern oder eine fehlerhafte Replikation bedingen können. Exogene Ursachen für DNS-Schäden sind in der Regel UV-Strahlung, ionisierende Strahlung oder die Einwirkung von Chemikalien. UV-Strahlung als eine wesentliche keimreduzierende Komponente im Plasma verursacht in Abhängigkeit der applizierten Dosis Strangbrüche und führt zu einer Ausbildung von Photoprodukten, wie Dimeren zwischen benachbart liegenden Thymin-Basen (Pyrimidin-Dimere) [SCHLEGEL, 1992]. Einer der wichtigsten Schäden an der DNS sind allerdings die Strangbrüche. Unterscheiden lassen sich Doppelstrangbrüche, also Fragmentierungen der beiden DNS-Stränge an der gleichen Stelle, und Einzelstrangbrüche. Angriffspunkte sind dabei die Phosphodiesterbindungen zwischen den Zuckerbausteinen.

Im Fall der kaskadierten Barrierenentladung sind sowohl Schäden durch den Excimer-Strahler als auch durch das direkte Plasma mit den Wirkmechanismen Strahlung, Radikalangriff und Teilchenbeschuss zu erwarten. Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es, DNS-Schäden, primär Strangbrüche, durch molekularbiologische Methoden nachzuweisen.

4.3.2.1 Quantitativer Nachweis von DNS-Schäden

Die quantitative Bestimmung der DNS-Schäden erfolgte über die Methodik der Realtime-PCR. Für die Standards wurden Verdünnungsreihen aus DNS-Isolaten von B. atrophaeus-Suspensionen bekannter Keimzahl angefertigt. In jeder Versuchsreihe wurden parallel zu den DNS-Messungen auch die Inaktivierungskinetiken erstellt. Zu Beginn erfolgten Versuche mit Endosporen von B. atrophaeus. Dafür wurden PET-Folien-Abschnitte durch das Sprühverfahren mit den Endosporen inokuliert. Ausgangskeimdichte betrug mehrere 10^6 KbE/4x4 cm² und die Die Plasmabehandlung erfolgte bei ca. 180 W mit Luft als Prozessgas (282 nm Excimer). Die applizierte Dosis wurde durch Variation der Behandlungsdauer in einer Zeitspanne von 0-25 s eingestellt. Durch die hohen Dosen sollte die DNS in hohem Maße geschädigt werden, so dass eine Abnahme der Konzentration mittels Realtime-PCR erfasst werden kann. Nach der Behandlung mit der kaskadierten Entladung erfolgte die Isolation bzw. Aufbereitung der bakteriellen DNS und die quantitative Messung mit der Realtime-PCR (s. Kap. 3.3). Für die Keimzahlbestimmung wurde die Oberfläche eingegossen (s. Kap. 3.1.6).



Abbildung 56: Einfluss einer Behandlung mit der KDBE auf die Keimzahl und die DNS-Konzentration bei Endosporen von *B. atrophaeus*, in Abhängigkeit von der Behandlungszeit (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Abbildung 56 zeigt die Inaktivierungskinetik und den Verlauf der relativen DNS-Konzentration. Die Abtötungskurve der Endosporen weist eine Reduktion von etwa sechs Zehnerpotenzen in höchstens sieben Sekunden auf und im weiteren Verlauf ein Tailing. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der DNS-Messungen nur eine Abnahme der relativen Konzentration um etwa eine Zehnerpotenz nach sieben Sekunden (Abb. 56). Mit Ausnahme von etwaigen Schwankungen kann eine weitere Reduktion der DNS bei längeren Behandlungszeiten nicht beobachtet werden. Nach der Standardgerade entspricht der Endwert einer "intakten" DNS-Menge von etwa 10⁵ Zellen.

In einem weiteren Versuch wurden vegetative Zellen von *B. atrophaeus* analysiert, die einen nicht so komplexen Zellaufbau aufweisen, und dadurch viel empfindlicher auf physikalische und chemische Umwelteinflüsse reagieren. Nachteilig bei der Verwendung vegetativer Zellen ist die relativ hohe Absterberate bei der Trocknung der verkeimten Proben. Daraus resultierte auch die geringe Wiederfindung bei den unbehandelten Referenzproben von etwa 10⁴ KbE/Objekt, bei einer theoretisch aufgebrachten Ausgangskeimzahl von mindestens 10⁷ KbE/Objekt. Ein zelluläres Absterben aufgrund von Austrocknung wirkt sich aber nicht unmittelbar auf die DNS aus, so dass von der ursprünglichen DNS-Menge ausgegangen werden kann – dies zeigen auch die quantitativen DNS-Messungen. Bei der Entkeimung der vegetativen Zellen konnte eine fast vollständige Sterilisation der Proben innerhalb einer Sekunde erreicht werden (Abb. 57).

Auch die Ergebnisse der DNS-Messungen belegen eine deutliche Abnahme der DNS-Konzentration mit zunehmender Behandlungsdauer. Im Vergleich zu dem vorherigen Versuch mit den Endosporen spiegelt sich hier die Empfindlichkeit der vegetativen Form gegenüber der KDBE wieder – eine Reduktion der DNS-Menge um fast drei Zehnerpotenzen in drei Sekunden. Daraus kann für die Endosporen eine erhöhte Schutzwirkung für die DNS abgeleitet werden. Wie der Fachliteratur zu entnehmen ist, liegen die Gründe hierfür im komplexen Aufbau der Endospore, der zahlreiche Hüllen unterschiedlicher Zusammensetzung aufweist. Zusätzlich ist die DNS im Sporenkern an spezifischen Proteinen gebunden, die diese zum Beispiel vor UV-Strahlung schützen [SETLOW, 2006]. Weiterhin zeigt sich zwischen drei und sieben Sekunden eine stationäre Phase bzw. ein leichter Anstieg der DNS- Konzentration. Ob es sich bei diesem Verlauf um einen Ausreißer handelte, sollte anhand von Wiederholungsversuchen geklärt werden.



Abbildung 57: Einfluss einer Behandlung mit der KDBE auf die Keimzahl und die DNS-Konzentration bei vegetativen Zellen von B. *atrophaeus*, in Abhängigkeit der Behandlungszeit (282 nm Excimer, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Abbildung 58 zeigt den Verlauf der DNS-Konzentration während der Behandlung mit der kaskadierten Barrierenentladung in drei unabhängigen Versuchen. Interessanterweise kann bei allen drei Kurven nahezu der gleiche Abtötungsverlauf beobachtet werden, mit einer Abnahme der relativen DNS-Konzentration um etwa drei Zehnerpotenzen in drei Sekunden und einem erneuten Anstieg von etwa einer Zehnerpotenz nach fünf Sekunden. Als Ursache für dieses Phänomen könnten zelluläre Reparatursysteme in Frage kommen, wie die Photoreaktivierung. Dabei handelt es sich um einen in vegetativen Bakterien weit verbreiteten Mechanismus, bei dem UV-induzierte Pyrimidin-Dimere (Cyclobutan-Ringe) durch das Enzym Photolyase gespalten werden. Vorraussetzung dafür ist Licht der Wellenlänge 340-400 nm, also ein Bereich, der vom Luftplasma durchaus emittiert wird [KNIPPERS, 1985].



Abbildung 58: Wiederholungsversuche belegen einen mehrphasigen Verlauf der DNS-Inaktivierungskinetik (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Dabei wird Lichtenergie von einem absorbierenden Chromophor aufgenommen und an den Cofaktor Flavinadenin-Dinukleotid (FAD) abgegeben. Die reduzierte Form FADH₂ liefert die erforderliche Energie zur Spaltung des Pyrimidin-Dimers durch die Photolyase [SCHLEICHER, 2002]. Möglicherweise ist für die Aktivierung des Enzyms eine bestimmte Lichtdosis erforderlich, was den plötzlichen Anstieg der DNS-Konzentration in der fortgeschrittenen Kinetik erklären könnte. SCHLEGEL [1985] berichtet, dass die Photoreaktivierung die Zahl der überlebenden Keime um etwa eine Zehnerpotenz erhöhen kann. Diese Größenordnung deckt sich in etwa mit den vorliegenden Ergebnissen bei der DNS-Konzentration. Eine Zunahme der Keimzahl konnte im Abtötungsverlauf nicht beobachtet werden, allerdings kann keine Aussage über die Vitalität der Zellen getroffen werden.

Ein Zutreffen dieser Annahme würde darauf hindeuten, dass zu Beginn der Behandlung mit der KDBE vor allem Pyrimidin-Dimere entstehen und somit klassische UV-Schäden vorliegen. Ob der vorliegende Testkeim *B. atrophaeus* (ehemals *subtilis*) über die Fähigkeit zur Photoreparatur verfügt und wie ausgeprägt diese ist, ist nicht bekannt. NICHOLSON [1995] konnte durch UV- Bestrahlungsversuche von Übernachtkulturen unterschiedlicher *Bacillus*-Spezies die Fähigkeit zur Photoreaktivierung auch bei *B. subtilis* nachweisen. Die Effizienz der Photoreaktivierung war für diesen Keim aber vergleichsweise niedrig. Möglicherweise ist die Ausprägung der Fähigkeit zur Reaktivierung vom spezifischen Mikroorganismenstamm oder dem Alter der Kultur abhängig [NICHOLSON, 1995]. Konträr dazu hat YASBIN [1985] berichtet, dass *B. subtilis* keinen Photoreparatur-Mechanismus besitzt.

Im Vergleich zur Abtötungskinetik erfolgt die Abnahme der DNS-Menge um einiges langsamer. Eine Erklärung hierfür liegt sicherlich in der angewandten Methodik, da nur ein kleiner Bereich der DNS von 219 bp durch die Taqman-Sonde detektiert wird. Da das gesamte bakterielle Genom in einer Größenordnung von einigen Millionen Basenpaaren liegt, sind Schäden in diesem kurzen Abschnitt sicherlich nicht so häufig wie in größeren DNS-Segmenten. Durch den Einsatz der sog. RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) sollte in nachfolgenden Versuchen ein größerer Bereich des Genoms qualitativ auf plasmainduzierte Schäden untersucht werden.

4.3.2.2 Qualitativer Nachweis von DNS-Schäden

Mit Hilfe der RAPD-PCR lassen sich DNS-Schäden oder Modifikationen auch bei wenig Zellmaterial qualitativ nachweisen. Die Grundlage dieses PCR-basierten Verfahrens bilden kurze Oligonukleotide (etwa 10 Basen), die an mehreren Stellen des bakteriellen Genoms binden können, woraus ein Organismus-spezifisches Bandenmuster (Fingerprint) resultiert. In der Theorie führen Doppelstrangbrüche und beidseitige Einzelstrangbrüche zu einer Fragmentierung des Genoms und damit zu kleineren Strängen, die in der PCR als Matrize (template) dienen. Dadurch wird das Enzym Polymerase an der Synthese eines neuen Einzelstranges behindert. Dies hätte das Verschwinden von PCR-Produkten im Bandenmuster zur Folge, wenn der Strangbruch bei einem Großteil der Zellen in dem relevanten DNS-Abschnitt erfolgt. Geht man von der statistischen Wahrscheinlichkeit aus, so kann man erwarten, dass größere Banden bevorzugt aus dem Muster verschwinden, da dort häufiger Strangbrüche in der entsprechenden Template-DNS auftreten als in kurzen

Abschnitten. Aber auch Photoprodukte oder plasmainduzierte Mutationen im DNS-Strang können das Bandenmuster des Fingerprints beeinflussen, sofern die intrazellulären Reparaturmechanismen (z.B. Photolyasen, Exonukleaseaktivität der Polymerase) diese nicht zu beseitigen vermögen.

Als Grundlage für die Versuche mit der RAPD-PCR dienten die DNS-Isolate, die bereits zur quantitativen Messung in Kapitel 4.3.2.1 verwendet wurden: DNS aus plasmabehandelten vegetativen Zellen und Endosporen von *B. atrophaeus*, nach unterschiedlichen Behandlungszeiten. Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte nach der molekularen Größe aufgetrennt und mit der Silberfärbung sichtbar gemacht. Diese Methode ermöglicht halb-quantitative Aussagen über die vorhandene DNS-Menge durch Vergleich der Intensität der Banden. Abbildung 59 zeigt das Bandenmuster der vegetativen Zellen von *B. atrophaeus*. Schon nach einer Behandlungsdauer von einer Sekunde weist das Muster erste Veränderungen durch zusätzlich erscheinende Banden auf. Ab fünf Sekunden sind bereits sämtliche Banden verschwunden, lediglich schwache PCR-Produkte lassen sich erahnen. Dies deutet auf eine massive Schädigung des bakteriellen Genoms.



Abbildung 59: Polyacrylamid-Gelelektrophorese einer RAPD-PCR plasmabehandelter vegetativer Zellen von *B. atrophaeus* (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Dieselben Messungen wurden mit der DNS aus den plasmabehandelten Endosporen durchgeführt (Abb. 60). Hier zeigen sich erst nach fünf Sekunden erste offensichtliche Veränderungen im Bandenmuster. Mit zunehmender Behandlungszeit tritt eine immer stärkere Aufhellung im oberen Bereich der Spur auf, was auf eine mengenmäßige Abnahme der PCR-Produkte mit hohem Molekulargewicht deutet. Des Weiteren kann eine Abschwächung der starken Banden und das erscheinen kleiner PCR-Produkte im unteren Bereich des Gels beobachtet werden. Dabei kann es sich um einen Sekundäreffekt handeln, der etwa durch die veränderten Mengenverhältnisse zwischen Primer und geschädigter Template-DNS zu erklären ist, wodurch zunächst schwach ausgeprägte Banden stärker hervortreten. Einen solchen Zusammenhang zwischen der DNS- bzw. Primer-Konzentration und der Größe der resultierenden PCR-Produkte einer RAPD-PCR, beschreiben WINK & WEHRLE [1994]. Dabei beobachteten sie eine Zunahme der kurzen Amplifikationsprodukte bei Abnahme der DNS-Konzentration und gleich bleibender Primer-Menge [WINK & WEHRLE, 1994].



Abbildung 60: Polyacrylamid-Gelelektrophorese einer RAPD-PCR plasmabehandelter Endosporen von *B. atrophaeus* (KDBE, 282 nm Excimer, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Der Vergleich beider Gele zeigt deutlich die Unterschiede in der Kinetik der DNS-Schädigung zwischen den vegetativen Zellen und der Sporenform. Die DNS der vegetativen Zellen lässt sich viel schneller schädigen. Als Ursache hierfür ist sicherlich die hohe Resistenz der Endosporen zu nennen. Dies spiegeln auch die angefertigten Abtötungskinetiken der Mikroorganismen in Abbildung 56 und 57 wider.

Es wurden auch qualitative Untersuchungen plasmainduzierter DNS-Schäden ohne das PCR-Verfahren durchgeführt. Auf diese Weise sollten Strangbrüche und andere Schäden in der Nukleotidkette nachgewiesen, und gleichzeitig mögliche Einflüsse durch die Amplifizierungsreaktion vermieden werden. Um die DNS ohne die PCR-Methodik in einem Polyacrylamid-Gel mit Silberfärbung deutlich sichtbar zu machen ist eine relativ hohe DNS-Menge erforderlich. Vorversuche ergaben, dass erst Isolate aus Mikroorganismenkulturen mit mindestens 10⁸ Zellen/ml eine intensive Bande im Gel ergeben.

Für die Experimente wurden jeweils 10 μ l einer aufkonzentrierten Sporensuspensionen von *B. atrophaeus* (10¹⁰ KbE/ml) linienförmig auf PET-Abschnitte (1x2 cm²) aufgetragen. Nach einer Trocknungsphase erfolgte die Behandlung in der kaskadierten Entladung mit Luft als Prozessgas und einer konstanten Leistung von etwa 160 W. Die Behandlungszeiten wurden in Zehnerintervallen von 0 bis 40 s erhöht - durch Auswahl langer Zeiten sollten etwaige Schäden eindeutig sichtbar gemacht werden. Aufgrund eines Defekts am 282 nm-Strahler kam ersatzweise ein XeCl^{*}-Strahler mit 307 nm Emission zum Einsatz. Unmittelbar nach der Behandlung erfolgten die DNS-Isolation und die elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamid-Gel.

Ref.	10 s	20 s	30 s	40 s
-				

Abbildung 61: Qualitative Darstellung des Einflusses einer KDBE-Behandlung (307 nm Excimer) mit Zeitvariation, auf die DNS von *Bacillus atrophaeus*-Endosporen.

Abbildung 61 zeigt qualitativ eine Abnahme der Intensität der Banden mit fortschreitender Behandlungszeit. Bei den unbehandelten Referenzen ist eine deutliche Bande erkennbar, nach 40 s ist nichts mehr detektierbar. Dies deutet auf eine Reduktion der DNS-Menge auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze der Silberfärbung hin, die mit 0,03 ng DNS/mm² deutlich niedriger liegt als bei anderen Färbemethoden, wie zum Beispiel dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 – 20 ng) [LOTTSPEICH & ZORBAS, 1998].

4.4 Experimente zur Packstoffmodifikation

Die kaskadierte Barrierenentladung wurde für die Entkeimung von flachen Packmaterialien entwickelt, z.B. Folien oder Platinen. Da es sich hier um ein Niedertemperaturplasma handelt, qualifiziert sich dieses Verfahren für die Behandlung von thermosensitiven Werkstoffen, wie PET oder PE. Voraussetzung für **KDBE** den industriellen Einsatz der ist der Erhalt wesentlicher Packstoffeigenschaften, wie der Gasdurchlässigkeit oder der Siegelnahtfestigkeit. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Standardbehandlung mit der KDBE auf wesentliche Charakteristika ausgewählter Kunststoffe untersucht. Voraussetzung für die dabei verwendeten Plasmaparameter war eine im mikrobiologischen Sinne ausreichende Behandlung. Aufgrund der hohen Resistenz der Konidiosporen von A. niger DSM 1957 wurden die Einstellungen so vorgenommen, dass eine Abtötung von mindestens fünf Zehnerpotenzen dieses Modellorganismus erreicht werden kann. Als ausreichend gilt dafür eine Behandlung mit Luft als Prozessgas, etwa 170 W Leistung und fünf Sekunden Dauer (s. Abb. 42). Diese Parameter gewährleisten gleichzeitig eine hohe Inaktivierungsrate bei allen getesteten Bakterien. Die packstofftechnische Analytik umfasste die folgenden Siegelnahtfestigkeit, Reibungszahl, Oberflächenenergie, Messgrößen: Gasdurchlässigkeit und Durchstoß.

Bei der Behandlung der Polystyrolfolien konnten vereinzelt Schädigungen der Oberfläche in Form von Löchern mit bis zu 1 mm Durchmesser beobachtet werden (Abb. 62). Dieser Effekt trat bevorzugt dann auf, wenn sich der Reaktor infolge von mehreren unmittelbar aufeinander folgenden Versuchen spürbar aufgeheizt hatte.



Abbildung 62: Stereomikroskopische Aufnahme einer plasmabehandelten Polystyrolfolie mit Oberflächendefekten (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W, Behandlungszeit: 5 s).

4.4.1 Siegelnahtfestigkeit

Eine wichtige verarbeitungstechnisch relevante Messgröße bei Polymerfolien ist die Siegelfähigkeit. Siegelungen werden in der Regel mit PE oder PE-Oberflächen bei der Herstellung von z.B. Beuteln durchgeführt, aber auch andere Polyolefine finden hier Anwendung. Als Kriterium für die Bewertung der Siegelfähigkeit von Folien dient die Nahtfestigkeit, welche nach dem ILV-Merkblatt 33 bestimmt wurde [ILV-Merkblatt 33, 1978]. Auf diese Weise wird das Rissbild der Siegelnaht ermittelt, woraus sich die entsprechenden Kennwerte der Nahtfestigkeit ergeben. Eine quantifizierende Beurteilung der Siegelnahtfestigkeiten kann dem VDMA-Einheitsblatt 8748 entnommen werden [VDMA, 1999]. Demnach wird zwischen Festverschluss (≥ 15 N/15 mm), Peelfestigkeit (2-6 N/15 mm) und Peelfestigkeit gasdichter Verpackungen ($\geq 4 \text{ N/15 mm}$) unterschieden. Bei den durchgeführten Experimenten erfolgte die Siegelung erst nach der Plasmabehandlung der PE-LD-Folien.Die Messungen parallel zur Materiallaufrichtung (MLR) resultierten in einer leichten Abnahme der Nahtfestigkeit um etwa 12% und quer zur Materiallaufrichtung um ca. 20% (Abb. 63). Nach dem VDMA-Einheitsblatt 8748 sind die Mittelwerte der behandelten PE-LD-Schicht mit ungefähr 35 N/15mm immer noch ausreichend, eine Siegelnaht mit Festverschluss zu erzeugen. Somit

können nach einer Plasmabehandlung mit der KDBE immer noch qualitativ hochwertige Siegelnähte erzeugt werden.



Abbildung 63: Siegelnahtfestigkeit behandelter und unbehandelter PE-LD-Schichten (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W, Behandlungszeit: 5 s).

4.4.2 Reibungszahl

Die Reibungszahl ist eine charakteristische Kenngröße für das Reibungsverhalten einer Kunststofffolie gegenüber einer anderen Oberfläche bei festgelegten Bedingungen. In der Praxis beeinflusst die Rauhigkeit der Folienoberfläche die Laufeigenschaften des Materials auf Verpackungs- oder Verarbeitungsmaschinen. Die Bestimmung der Reibungszahl erfolgte entsprechend DIN 53375 mit einer elektromagnetischen Zugprüfanlage. Abbildung 64 zeigt die Veränderung der Reibungszahl verschiedener Polymerfolien infolge einer Behandlung mit der KDBE. Dabei konnte sowohl bei PET als auch beim PS eine Zunahme der Gleitreibungszahl von etwa 25% gemessen werden. Bei dem PET/PE-LD-Verbund betrug die Steigerung sogar 40%. Dies deutet auf strukturelle Veränderungen der Oberfläche hin. Von den betrachteten Materialien kommt lediglich der PET/PE-Verbund in Schlauchbeutelmaschinen zur Anwendung.



Abbildung 64: Gleitreibungszahl µ behandelter und unbehandelter Polymerfolien (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W, Behandlungszeit: 5 s).

HOHMANN & MÜNDERLEIN [1989] untersuchten die Abzugsbedingungen für vertikale Schlauchbeutelmaschinen mit Riemenabzug und berichten von einer Obergrenze des Gleitreibungskoeffizienten von 0,2 bis 0,3 (in Abhängigkeit der Biegesteifigkeit). Die mittlere Gleitreibung der behandelten PE-Seite lag bei etwa 0,35. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung und auf Grundlage der genannten Grenzwerte, ist die Modifikation durch das Plasma zwar grenzwertig, aber tolerierbar. Die realen Anforderungen an die Reibungszahl sind von der jeweiligen Verpackungsmaschine abhängig.

4.4.3 Oberflächenenergie

Eine Behandlung polymerer Oberflächen mit sauerstoffhaltigen Plasmen, also auch Luftplasmen, bedingt eine Anlagerung hydrophiler Gruppen (Funktionalisierung) woraus eine Erhöhung der Oberflächenenergie resultiert. Dies führt allgemein zu einer besseren Benetzbarkeit der Kunststoffe und ist ein gängiges Verfahren in der industriellen Verarbeitung. Dabei kann die Oberflächenenergie als ein relatives Maß für die Einschätzung der Druckfarbannahme und der voraussichtlichen Haftung einer Druckfarbe oder einer anderen Beschichtung auf dem Substrat angesehen werden. Bei der Behandlung der drei polymeren Materialien mit der KDBE ist mit einer Erhöhung der Oberflächenenergie zu rechnen. Die Messung der Oberflächenenergie wurde mit Testtinten durchgeführt.

Wie erwartet zeigen die Ergebnisse bei PET und PS eine deutliche Zunahme der Oberflächenenergie nach einer Behandlungszeit von 5 s (Tab. 9). Werte über ca. 38-40 mN/m führen zu guten Haftvoraussetzungen, so dass bei diesen beiden Kunststoffen mit Werten von über 70 mN/m eine wesentliche Verbesserung der Benetzbarkeit durch die Behandlung erreicht werden konnte. Die PE-LD-Beschichtung des Verbundpolymers wies anfänglich eine sehr geringe Oberflächenenergie auf, die unterhalb des Messbereichs der Testtinten lag. Durch die Behandlung konnte die Oberflächenenergie auf etwa 36 mN/m erhöht werden.

Tabelle 9: Mittlere relative Oberflächenenergien behandelter und unbehandelter Polymerfolien (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W, Behandlungszeit: 5 s).

Polymer	unbehandelt [mN/m]	behandelt [mN/m]
PET	40	> 72
PS	30	72
PET/PE-LD-Verbund	< 28 (PE-LD-Seite)	36 (PE-LD-Seite)

4.4.4 Sauerstoffdurchlässigkeit

Das Vorhandensein von Sauerstoff in Verpackungen kann die Qualität des Füllgutes infolge von Oxidationsvorgängen nachteilig beeinflussen. Besonders Kunststoffe wie PET weisen Strukturen auf, die eine Permeation von Gasen durch das Material ermöglichen. Im Rahmen dieser Versuche sollte der Einfluss der Plasmabehandlung auf die Sauerstoffdurchlässigkeit der Kunststoffe analysiert werden. Die Messung der Kenngröße erfolgte nach DIN 53380-3 an allen drei Kunststoffen mit einem elektrochemischen Sensor. Dieses Verfahren misst das Volumen an Sauerstoff, das je

Fläche, Zeit und Sauerstoffpartialdruck durch die Probe hindurchtritt – also die flächenbezogene Sauerstoffdurchlässigkeit [DIN 53380-3, 1998].

Die Messungen an den behandelten Folien haben gezeigt, dass sich die Sauerstoffdurchlässigkeit bei den Kunststoffen PET und PS im Wesentlichen nicht ändert (Abb. 65).



Abbildung 65: Sauerstoffdurchlässigkeit behandelter und unbehandelter Polymerfolien (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W, Behandlungszeit: 5 s).

Bei dem PET/PE-LD-Verbund hingegen wird eine Erhöhung um fast 28% verzeichnet, von mittleren 6,5 cm³/(m²·d·bar) auf etwa 8,3 cm³/(m²·d·bar). Eine Zunahme dieser Messgröße um über 10% stellt eine signifikante Veränderung dar, die sich bei sauerstoffempfindlichen Lebensmitteln negativ auf die Qualität bzw. Haltbarkeit auswirken kann [TEICHMANN, 2007, mdl. Mitt.]. Die Relevanz der gemessenen Abweichung für die Praxis ist letztendlich von der Sauerstoffaufnahme und -toleranz des jeweiligen Füllgutes abhängig.

4.4.5 Durchstoßfestigkeit

Das Prüfverfahren nach DIN 53373 dient der Beurteilung des Verhaltens von Folien bei Stoßbeanspruchungen senkrecht zur Oberfläche und ermöglicht, das Arbeitsaufnahmevermögen W_S , die Durchstoßkraft F_S und die Verformbarkeit I_S miteinander zu vergleichen.

Eine Veränderung der Sprödigkeit bzw. Zähigkeit des Materials infolge der Plasmabehandlung würde eine Veränderung dieser Kenngrößen mit sich führen. Die Untersuchungen zur Durchstoßfestigkeit ergaben keine auffälligen Veränderungen der Messgrößen bei allen drei Kunststoffen. (Abb. 66, 67, 68).



Abbildung 66: Schädigungskraft F_s bei behandelten und unbehandelten Polymerfolien (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W, Behandlungszeit: 5 s).



Abbildung 67: Schädigungsarbeit W_S bei behandelten u. unbehandelten Polymerfolien (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W, Behandlungszeit: 5 s).



Abbildung 68: Schädigungsverformung l_s bei behandelten und unbehandelten Polymerfolien (KDBE, 282 nm Excimer, Prozessgas: Umgebungsluft, Leistung: ca. 170 W, Behandlungszeit: 5 s).

4.5 Folgerungen zur industriellen Umsetzbarkeit

Im Lebensmittelbereich ist die Leistungsfähigkeit eines Entkeimungsverfahrens von wirtschaftlicher Bedeutung. Für die hohe Produktivität eines Abfüllprozesses ist eine kontinuierliche Behandlung der Packmittel bei möglichst kurzen Zeiten erforderlich. Gemessen an den etablierten nasschemischen Verfahren (z.B. Wasserstoffperoxid, Peressigsäure) weist die Plasmatechnik in diesem Zusammenhang einige Vorteile auf. Zum einen ist keine thermische Aktivierung und zum anderen kein aufwändiger Entfernungsschritt etwaiger Rückstände notwendig. Dadurch könnten sich vereinfachen maschinentechnisch Entkeimungsprozesse und bei gleicher Ausbringung die reine Behandlungszeit verlängern lassen. Im Umkehrschluss wäre durch eine Verkürzung der Entkeimungsdauer auch eine Erhöhung der Produktivität denkbar. Bei der Wasserstoffperoxidtechnologie liegt zum Beispiel eine Kombination aus Auftragung vom Agens mit einer Konzentration zwischen 30% und 40% (Immersionsbad, Sprüh- oder Dampfverfahren) und thermischer Aktivierung mit heißer Luft (> 70°C) vor. Speziell bei der Behandlung polymerer Werkstoffe stellt die Temperatur einen limitierenden Faktor dar. Verpackungen aus PET erfordern überwiegend Temperaturen unter ca. 75°C (Glasübergangs-temperatur für teilkristallines PET), woraus auch bei hohen H₂O₂-Konzentrationen eine langsamere Abtötung resultiert [DOMININGHAUS, 1998]. Praxisgerechte Entkeimungsraten erfordern allerdings höhere Temperaturen.

Auch gegenüber Bestrahlungsverfahren können Gasplasmen einige Vorzüge bieten. Im Vergleich zur UV-Entkeimung ist eine Reduzierung des Einflusses durch etwaige Abschattungseffekte möglich. Da es sich bei einem Plasma definitionsgemäß um eine gasförmige Zustandsform handelt, kann die Wirkung auch in unzugänglichen Stellen (z.B. Spalten, Falze) erfolgen, sofern es einzudringen vermag. Als Vorteile gegenüber ionisierender Strahlung (z.B. Gama- oder Elektronenstrahlen) sind sicherlich die geringeren Apparatekosten bzw. Sicherheitsanforderungen und das damit verbundene niedrigere Preisniveau der Plasmaanlagen zu nennen.

Die durchgeführten Versuche im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die hier untersuchte kaskadierte Barrierenentladung eine schnelle Oberflächenentkeimung von flachen Polymerfolien unter Erhalt der Materialeigenschaften ermöglicht. Dafür wurde ein breites Spektrum unterschiedlicher Mikroorganismen herangezogen und getestet. Darunter auch gängige Bioindikatoren wie B. atrophaeus oder B. pumilus. Damit eignet sich die KDBE auf jeden Fall für die Teilentkeimung von Packstoffen. Bei der Aseptik existieren bis dato noch keine Anforderungen an die Entkeimungsleistung einer solchen Plasmaanlage. Unter Verwendung von Wasserstoffperoxid bestehen zum Beispiel folgende gesetzliche Vorgaben und Richtlinien an die Mindestanforderungen bei der Entkeimung von Packstoffen: fünf Zehnerpotenzen B. subtilis A nach NFL und vier Zehnerpotenzen B. subtilis SA 22 nach VDMA. Gemessen an diesen Werten hat die KDBE das Potential als neuartiges Sterilisationsverfahren zur Anwendung zu kommen. Das oft geforderte 12-D-Konzept bei Cl. botulinum ist theoretisch bereits nach zwei Sekunden erfüllt. Allerdings sind für diese Methode noch die entsprechenden Testkeime mit ausgeprägter Resistenz zu definieren. Als relativ widerstandsfähig haben sich die Konidiosporen von A. niger erwiesen. Bei A. niger DSM 1957 waren fünf Sekunden für eine Reduktion um fünf Zehnerpotenzen erforderlich und bei A. niger DSM 1988 sogar noch längere Zeiten. Nach dieser Behandlungsdauer sind bereits alle untersuchten Bakterien (veg. Zellen und Endosporen) sicher um mindestens fünf Zehnerpotenzen inaktiviert worden (die genannten Ergebnisse beziehen sich auf Versuche mit dem Prozessgas Luft und einem 282 nm Excimer-Strahler). Bei Verwendung dieser Parameter und auf Grundlage der bisher überprüften Testkeime, haben sich A. niger Konidiosporen als adäquate Modellorganismen qualifiziert - für Validierungsverfahren und Optimierungsvorhaben. Die Verwendung anderer Parametersätze die verbundene und damit Veränderung der Plasma-Wirkmechanismen könnte die Auswahl geeigneter Testkeime beeinflussen.

Die kaskadierte Barrierenentladung wurde für die Behandlung von flachen Substraten (z.B. Folien, Deckel, Platinen) entwickelt. Aufgrund ihrer einfachen Bauweise sollte sie sich problemlos in bestehende Abfüllanlagen (z.B. Tiefziehanlagen) integrieren lassen. Der Betrieb bei Atmosphärendruck und niedrigen Temperaturen ermöglicht die kontinuierliche Behandlung von thermosensitiven Materialien (z.B. PE, PET). Die Nutzung von Umgebungsluft als Prozessgas trägt durch den Wegfall von Chemikalienkosten zu einem ökonomischen Betrieb der Anlage bei.

Betrachtung soll exemplarisch einen Überblick Nachfolgende über den Größenbereich der anfallenden Kosten bei Integration dieses Systems in eine Tiefziehanlage (Joghurtbecher) geben. Die Preise für den Excimer-Flachstrahler liegen bei Einzelanfertigung in einem Bereich von ungefähr 7-10 €/(cm² Behandlungsfläche). Damit macht der Strahler sicherlich einen wesentlichen Teil der Kosten einer Industrieanlage aus. Bei Verwendung einer Excimer-Gasmischung mit Emission bei 282 nm ist anstelle des synthetischen Suprasil-Quarzes (z.B. beim 172 nm-Strahler) ein herkömmliches Quarzglas mit geringerer Reinheit bzw. Transmissionsbereich ausreichend und somit günstiger. Hinzu kommen noch weitere Anlagenteile (z.B. Generatortechnik, Kühlung), wodurch für einen Prototyp insgesamt mit Kosten in einem Bereich von etwa 15 €/(cm² Behandlungsfläche) zu rechnen sind. Die erforderlichen Kosten für ein Entkeimungsmodul, basierend auf dem Prinzip der kaskadierten Barrierenentladung, ergeben sich aus nachstehenden Überlegungen (Werte sind der Praxis entnommen):

Tiefziehanlage für die aseptische Abfüllung von Bechern

Nennausbringung: ca. 43200 Becher/Std.

Taktzahl v_A [min⁻¹]:30Taktdauer t_A [min]:0,0331 Takt entspricht der Abzugslänge l_A .Abzugslänge l_A [m]:0,32Arbeitsbreite b_A [m]:0,48

Der Abzug der Folie vom Rollenbock erfolgt kontinuierlich über eine Tänzerwalze mit der Geschwindigkeit v_A:

$$v_A = \frac{l_A}{t_A} = \frac{0.32 \text{ m}}{0.033 \text{ min}} = 9.7 \frac{\text{m}}{\text{min}}$$
 (Gl. 35)

 v_A entspricht der Mindestgeschwindigkeit mit der die Folie durch das Entkeimungsmodul laufen muss, um die Nennausbringung von ungefähr 43200 Bechern/Std. zu gewährleisten. Bei der Kalkulation der KDBE-Einheit wird von Kosten für etwa 15 €/(cm² Behandlungsfläche) ausgegangen. Dabei handelt es sich um Werte für einen Prototyp, d.h. bei Serienfertigung würden die Kosten deutlich niedriger liegen. Aus fertigungstechnischen Gründen ist es günstiger den Excimer-Flachstrahler mit einer Länge (l_E) von 50 cm und einer Breite (b_E) von lediglich 3 cm herzustellen, da dafür kommerzielle Ouarzröhren verwendet werden Die können. Anfertigung großflächiger Planarstrahler ist zwar möglich, aber äußert aufwendig und kostspielig, da es sich meistens um Einzelstücke handelt. Für die Behandlung größerer Flächen bzw. bei höheren Bahngeschwindigkeiten ist somit eine Aneinanderreihung mehrerer kleinerer Module erforderlich. Dies bringt den Vorteil Excimer-Strahler mit unterschiedlichen Gasfüllungen und variierenden Emissionsmaxima zu kombinieren, und dadurch ein breites Spektrum und eine Optimierung hinsichtlich der mikrobiellen Abtötung von z.B. A. niger zu erreichen (s. Kap. 4.2.2).

Die Kosten K_{PE} für ein Entkeimungsmodul berechnen sich wie folgt:

$$K_{PE} = I_E \times b_E \times 15 \frac{\epsilon}{cm^2} = 50 \text{ cm} \times 3 \text{ cm} \times 15 \frac{\epsilon}{cm^2} = 2250 \frac{\epsilon}{\text{Einheit}}$$
(Gl. 36)

Bei der Festlegung der erforderlichen Behandlungszeit der Folienbahn wurde sich an den mikrobiologischen Daten des Laborreaktors orientiert. Für die sichere Abtötung der bisher getesteten Mikroorganismen (Bakterien, Endosporen, *A. niger* DSM 1957) um mindestens fünf Zehnerpotenzen sind bei Luft als Prozessgas und ca. 170 W Leistung fünf Sekunden (t_B) ausreichend. Dabei handelt es sich allerdings um die Parameter der Laboranlage mit einer Spalthöhe von 1 mm. Eine Skalierung des Systems würde sicherlich höhere Leistungen erfordern und eine erneute Evaluierung der Entkeimungseffizienz notwendig machen. Daraus ergibt sich für das Modul folgende Bahngeschwindigkeit v_B:

$$v_{\rm B} = \frac{l_{\rm E}}{t_{\rm B}} = \frac{0.03 \text{ m}}{5 \text{ s}} = 0.006 \frac{\text{m}}{\text{s}} = 0.36 \frac{\text{m}}{\text{min}}$$
 (Gl. 37)

Die notwendige Bahngeschwindigkeit von 9,7 m/min wird durch die Hintereinanderschaltung mehrer Plasmaeinheiten (N_{PE}) erreicht. Der Quotient aus

Abzugsgeschwindigkeit v_A und Bahngeschwindigkeit für ein Modul ergibt die erforderliche Zahl an Plasmaeinheiten. Die Gesamtkosten K_{Ges} ergeben sich aus dem berechneten Preis für ein Entkeimungsmodul.

$$N_{PE} = \frac{v_A}{v_B} = \frac{9.7}{0.36} = 27$$
 Einheiten (Gl. 38)

$$K_{Ges} = K_{PE} \times N_{PE} = 2250 \frac{\notin}{\text{Einheit}} \times 27 \text{ Einheiten} = 60750 \notin (Gl. 39)$$

Der Preis für das KDBE-Plasmamodul bewegt sich damit in einem Bereich von ca. 60000 € (lediglich eine Größenordnung). Bei Serienfertigung ist sicherlich mit geringeren Anschaffungskosten zu rechnen. Aussagen über Laufzeiten oder Wartungsintervalle ermöglichen erst praktische Erfahrungswerte. Eine Abschätzung der Energiekosten ist augrund der fehlenden Kenntnisse über die erforderliche Leistung einer skalierten Anlage noch nicht möglich.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfasst die praxisbezogene Bewertung der Leistungsfähigkeit eines neuartigen Plasmasystems, der kaskadierten dielektrischen Barrierenentladung (KDBE), für die Entkeimung von lebensmittelrelevanten Kunststofffolien. Dabei wurden drei wesentliche Aspekte untersucht: die mikrobiologische Entkeimungseffizienz, die Plasma-wirkmechanismen und die Auswirkungen einer Standardbehandlung auf die Packstoffeigenschaften. Die Zusammenfassung der ermittelten Ergebnisse bzw. gewonnenen Erkenntnisse und die sich daraus ergebenden Überlegungen zur industriellen Umsetzbarkeit werden nachfolgend dargestellt.

5.1 Zusammenfassung der mikrobiologischen Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die KDBE mit Luft als effiziente Prozessgas eine schnelle und Entkeimung über ein breites mikrobiologisches Spektrum ermöglicht. **Bereits** nach einer Sekunde Behandlungszeit konnten fast alle Vertreter der vegetativen Bakterien (darunter lebensmittelrelevante Krankheitserreger, wie Salmonellen oder Stahphylokokken) vollständig inaktiviert und dabei eine Keimreduktion von bis zu 6,9 Zehnerpotenzen (Staph. aureus) erzielt werden. Die Versuche unter Einsatz verschiedener Endosporen ergaben Abtötungsraten von mindestens fünf Zehnerpotenzen pro Sekunde, wobei sich bei Cl. botulinum, einem Vertreter der Sporenbildner mit ausgeprägter humanpathogener Relevanz, kein Wachstum mehr nachweisen ließ. Insgesamt haben sich die bakteriellen Endosporen, vor allem B. atrophaeus, als etwas widerstandsfähiger gegenüber einer Behandlung mit der KDBE erwiesen als die vegetativen Zellen. Dies kann sicherlich auf die komplexe Struktur der Endosporen zurückgeführt werden. Auffallend war in diesem Zusammenhang ein zweiphasiger Abtötungsverlauf (Tailing). In diesem Fall ist es denkbar, dass es sich Auswirkungen hohen Keimdichte auf der um der Probe handelt

(Abschattungseffekte), da Restkeime auf unbehandelten Teilflächen (z.B. Rückseite) mit der angewandten Nachweismethodik nicht erfasst wurden.

Eine weitere Erklärung könnte entsprechend dem vitalistischen Konzept eine Resistenzverteilung innerhalb der Mikroorganismenpopulation sein.

Insgesamt haben sich beim Screening der unterschiedlichen Modellkeime die Konidiosporen von A. niger als besonders resistent erwiesen. Innerhalb der ersten Sekunde konnte nur eine Inaktivierung der Sporen um drei Zehnerpotenzen bei A. niger DSM 1957 und lediglich eine Zehnerpotenz bei A. niger DSM 1988 beobachtet werden. Damit haben sich die beiden Stämme von A. niger als potentielle Testkeime für dieses Plasmasystem qualifiziert. Aufgrund der schwarzen Pigmentierung sind die Konidiosporen gegenüber UV-Strahlung ausgesprochen widerstandsfähig [CERNY, 1990]. So liegt der auf die Dosis bezogene D-Wert für A. niger (Stamm unbekannt) bei der UV-Entkeimung in einer Größenordnung von etwa 1800 J/m². Im Gegensatz dazu liegt der D-Wert für B. subtilis bei ca. 120 J/m² (Wellenlänge nicht angegeben) [NELSON, 1990]. Gleichzeitig sind A. niger Konidiosporen sehr empfindlich gegenüber Oxidationsvorgängen [REUTER, 1986]. Dies könnte einen Hinweis auf den dominierenden Wirkmechanismus in der KDBE liefern. Die beobachteten Variationen in der Abtötung der verschiedenen Keime unterstreichen die Notwendigkeit der praktischen Evaluierung neuartiger Entkeimungsverfahren gegenüber einer Bandbreite diverser Mikroorganismen, zum Zwecke der Festlegung geeigneter Testkeime und Validierungsroutinen.

Die Ursache für die Resistenzunterschiede zwischen den beiden *A. niger*-Stämmen liegt möglicherweise im strukturellen Aufbau der Konidiosporen. Augenscheinlich ist die gezackte Hülle vom Stamm DSM 1988, während der Stamm DSM 1957 eine glatte Oberfläche aufweist. Möglicherweise besitzt der Stamm DSM 1988 dadurch eine dickere Sporenhülle, aber auch andere Faktoren können für die höhere Widerstandsfähigkeit ausschlaggebend sein. Da Schimmelpilzsporen ubiquitär und relevante Verderbsorganismen in der Lebensmittelbranche sind, ist es erforderlich die Entkeimungseffizienz auf diese Mikroorganismen zu fokussieren und durch geeignete Optimierungsmaßnahmen eine Leistungssteigerung anzustreben. Dabei wurde versucht die Abtötungseffizienz zum einen über die relative Luftfeuchte des Prozessgases, als auch über eine Variation des Excimer-Strahlers zu erhöhen. Aufgrund der moderaten Entkeimungseffizienz bei den Konidiosporen von *A. niger* wurde eine Optimierung durch Variation der relativen Feuchte von Luft angestrebt. Die Versuche mit den Konidiosporen von *A. niger* DSM 1957 haben gezeigt, dass hohe relative Luftfeuchten von mind. 70% zu einer Steigerung der Entkeimungsleistung führen, wobei sich der positive Effekt erst bei längeren Behandlungszeiten deutlich abzeichnete. Die höchste Inaktivierung konnte bei 70% relativer Feuchte erreicht werden. Als Ursache hierfür ist eine zeitabhängige Anreicherung der reaktiven Spezies durch Dissoziation von Wassermolekülen denkbar, vor allem Hydroxylradikalen und dessen Reaktionsprodukten, die zu einer Steigerung der Abtötung von *A. niger* bei verlängerten Behandlungszeiten führen könnten.

Im Fall von B. subtilis-Endosporen wurde eine diametrale Verlangsamung der Inaktivierung bei hohen Luftfeuchten beobachtet. Bei dem verwendeten B. subtilis-Stamm handelte es sich um einen Mikroorganismus mit einer stark ausgeprägten Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid oder ähnlichen Oxidationsvorgängen. Damit ist sicherlich auch eine relative Widerstandsfähigkeit gegenüber den Hydroxylradikalen gegeben. Bei diesem Testkeim ist UV-Strahlung als ein wesentlicher Wirkmechanismus zu nennen. Nach FALKENSTEIN [1997b] und FALKENSTEIN & COOGAN [1997] führt eine Erhöhung der Luftfeuchte des Prozessgases zu einer Abnahme der Plasmafilamente und damit zu einer Verschlechterung der Homogenität im Entladungsspalt. Dies bestätigen Homogenitätsmessungen an der dielektrischen Barrierenentladung, die an der RWTH Aachen mit unterschiedlichen Gasen erfolgten. Dieser Effekt könnte als Ursache für die Abnahme der Entkeimungseffizienz von B. subtilis in Betracht gezogen werden. Mögliche Auswirkungen einer erhöhten Luftfeuchte auf die Homogenität der KDBE müssen erforscht werden. Als Konsequenz für eine praktische Anwendung wäre eine Aneinanderreihung zweier KDBE-Einheiten in Serie mit unterschiedlichen Prozessgasen erforderlich, um ein möglichst breites Wirkspektrum zu erlangen. Zum einen trockene Luft für die Inaktivierung von z.B. B. subtilis-Endosporen und zum anderen konditionierte Luft mit hoher Feuchte für oxidationsempfindliche Schimmelpilze. Um einen maximal positiven Effekt zu erreichen ist es sicherlich sinnvoll, den möglichen Einfluss der Luftfeuchte bei jeder mikrobiologischen Plasmaanwendung zu evaluieren und die relative Luftfeuchte auf Werte einzustellen, die eine optimale Wirkung gegenüber möglichst viele Mikroorganismen erlauben.

Die Variation der emittierten Strahlung des Excimers durch Auswahl geeigneter Gasfüllungen, ist eine weitere Optimierungsmöglichkeit. Versuche mit einem energiereichen Xe₂^{*}-Strahler (172 nm) führten zu einer schnelleren Inaktivierung der Konidiosporen von A. niger. Bei dem Stamm DSM 1957 konnte die Abtötung in einem Zeitraum von einer Sekunde um etwa zwei Zehnerpotenzen erhöht werden, wohingegen die Steigerung bei DSM 1988 nur knapp eine Zehnerpotenz betrug. Die absolute Reduktion lag bei A. niger DSM 1988 mit etwa drei Zehnerpotenzen in einer Sekunde deutlich niedriger, als bei A. niger DSM 1957 mit fast sechs Zehnerpotenzen. Dies spiegelt die hohe Resistenz dieses Vertreters der Spezies A. niger wider. Als denkbare Ursache für die Leistungssteigerung kann die Photodissoziation von Gasmolekülen, wie Sauerstoff oder Wasser, durch den energiereichen 172 nm Strahler, zu reaktiven Spezies genannt werden. Bei den Endosporen von B. atrophaeus konnte kein positiver Effekt auf die Abtötung durch den 172 nm-Strahler erreicht werden. Tendenziell war die Reduktion sogar etwas schlechter als bei dem 282 nm-Strahler. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Abschwächung der 172 nm-Strahlung infolge von Absorption durch Gasmoleküle, die sich negativ auf die Abtötung von B. atrophaeus auswirken könnte. Besonders der molekulare Sauerstoff absorbiert im Bereich des 172 nm Strahlers (Schumann-Runge). Ozon hat das Absorptionsmaximum bei etwa 260 nm und schwächt den 282 nm Strahler. Da aber anteilsmäßig mehr Sauerstoff in der Luft vorhanden ist als Ozon, wird der 172 nm-Strahler stärker abgeschwächt.

5.2 Zusammenfassung zu den Plasma-Wirkmechanismen

Die durchgeführten Experimente mit behandelten Zellen und Endosporen von *B. atrophaeus* weisen auf eine vielseitige Plasmawirkung hin. DNS-Messungen, qualitativ als auch quantitativ, belegen der kaskadierten Entladung eine dosisabhängige Schädigung dieses Makromoleküls. Unter Verwendung der

Realtime-PCR konnte ein Rückgang der relativen DNS-Konzentration mit zunehmender Behandlungszeit gemessen werden. Bei gleicher applizierter Dosis war das Ausmaß der DNS-Reduktion bei den vegetativen Zellen höher als bei den Endosporen. Aufgrund der Unterschiede im strukturellen Aufbau und der funktionalen Zusammensetzung war dies auch abzusehen. Auffällig war, dass trotz der beinah vollständigen Inaktivierung der Mikroorganismen eine relativ hohe Konzentration an intakter DNS verblieb und damit eine zeitabhängige Diskrepanz zwischen beiden Inaktivierungswegen vorlag. Die Ursachen hierfür können vielseitig sein. Methodisch betrachtet wurde mit der Realtime-PCR nur ein kleiner Teil des bakteriellen Genoms mit einer Größe von 219 Basenpaaren untersucht. Das gesamte Erbgut weist aber mehrere Millionen Basenpaare auf, womit die Wahrscheinlichkeit von detektierbaren Schäden in diesem spezifischen Abschnitt zwar gering ist, aber mit zunehmender Behandlungszeit ansteigt. In diesem Zeitraum kommt es aber auch zu Veränderungen in anderen Bereichen des Genoms, die durch diese Meßmethode nicht erfasst werden. Somit treten sicherlich noch weitere letale Modifikationen der DNS (z.B. Photoprodukte) und zusätzliche Schäden an der Zellstruktur auf (z.B. Membran oder Zellwand). Diese Überlegung wird gestützt durch die in Kapitel 4.6.1 dargestellten Veränderungen an der Zellwand bzw. der Sporenhülle. Im Vergleich zu der unbehandelten Referenzprobe gelang es mit Hilfe von REM-Aufnahmen, eine strukturelle Modifikation der Sporenoberfläche bei B. atrophaeus nachzuweisen. Dieser Effekt konnte bereits nach 10 s Behandlung beobachtet werden. Bei 30 s wies die Sporenhülle wieder eine glatte Oberfläche auf. Möglicherweise handelte es sich hier um Erosionsvorgänge der Sporenhülle infolge von Radikalreaktionen und UVinduzierter Photodesorption. Untersuchungen an vegetativen Zellen mit einer grambasierten Färbemethode zeigen Modifikationen an der Zellwand. Diese äußerten sich durch den Austritt eines intrazellulär eingeschlossenen Farbstoffs bei den behandelten Zellen, während sich die unbehandelten Referenzzellen nicht entfärben ließen. Des Weiteren konnte ein Schrumpfen der Zellen beobachtet werden, was auf einen möglichen Wasserverlust deutet.

Die vielen zellulären Veränderungen infolge der Plasmabehandlung machen es schwierig eine allgemeine Aussage über den primären biologischen Angriffspunkt zu treffen, dessen Schädigung zu einem Absterben der Mikroorganismen führt. Aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen im Plasma liegt eine Kombination aus mehreren Letalfaktoren vor, die mit Ausnahme der UV-Strahlung schwierig zu separieren sind. Allerdings ist das gleichzeitige Auftreten und die synergistische Wirkung der unterschiedlichen Mechanismen (UV-Strahlung, Teilchenbeschuss, Radikale) ein großer Vorteil der Plasmaentkeimung.

5.3 Zusammenfassung der Packstoffanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer "Standard"-Behandlung mit der KDBE auf charakteristische Eigenschaften ausgewählter Kunststoffe untersucht. "Standard"-Behandlung bedeutete in diesem Fall einen Parametersatz, der nach den bisherigen Erkenntnissen eine biologisch ausreichende Abtötung aller bisher getesteten Modellorganismen gewährleistet. Für eine Abtötung von mindestens fünf Zehnerpotenzen, auch der widerstandsfähigen Konidiosporen von A. niger, war bei maximaler Leistung (ca. 170 W) und Umgebungsluft als Prozessgas eine Zeitdauer von ungefähr 5 s erforderlich. Analysiert wurden eine PS-Folie (200 μm), eine PET/PE-Verbundfolie (14 μm PET/ 80 μm PE-LD) und eine PET-Folie (190 µm) auf die Modifikation der folgenden Eigenschaften: Durchstoßfestigkeit, Sauerstoffdurchlässigkeit, Siegelnahtfestigkeit, Reibungszahl und Oberflächenenergie. Bei der Durchstoßfestigkeit, die eine Aussage über die Sprödigkeit bzw. Zähigkeit des Materials erlaubt, konnten nach dem Behandlungszeitraum von fünf Sekunden keine wesentlichen Veränderungen festgestellt werden. Allerdings wiesen alle Folien eine Erhöhung der Gleitreibungszahl auf. Diese dimensionslose Messgröße spiegelt die Rauhigkeit der Oberfläche wieder und ist ein wichtiger Faktor zur Beurteilung der Maschinengängigkeit von Folien in Verpackungsanlagen. HOHMANN & MÜNDERLEIN [1989] beschrieben anlagenspezifische Obergrenzen für Gleitreibungszahlen in einem Bereich von 0,2-0,3. Für die Herstellung von Schlauchbeuteln kommt von den drei getesteten Polymeren nur der PET/PE-LD-Verbund in Frage. Hier konnte infolge der Behandlung eine Erhöhung um ca. 40% auf den Mittelwert von 0,35 verzeichnet werden. Damit wurde die Rauhigkeit sichtlich erhöht. Inwieweit sich diese Veränderung auf die praktische Anwendung auswirkt, ist von den Anforderungen der jeweiligen Verpackungsmaschine abhängig. Die PE-LD-Schicht des Verbundmaterials wurde auf Siegelnahtfestigkeit untersucht.

Dies ist eine wesentliche verarbeitungstechnische Einflussgröße bei der Herstellung von Beuteln. Dabei führte die Behandlung mit dem Plasmaverfahren zu einer Abnahme der Nahtfestigkeit. Die Reduktion lag in einer Größenordnung von etwa 12% bzw. 20% - je nachdem ob die Siegelnaht parallel oder quer zur Materiallaufrichtung verlief. Im Mittel wurde eine Nahtfestigkeit von ungefähr 35 N/15 mm erreicht, was deutlich über den vom VDMA geforderten Wert von mindestens 15 N/15mm für Festverschlüsse lag [VDMA, 1999]. Durch die Behandlung mit der KDBE konnte an allen Materialien eine Erhöhung der Oberflächenenergie erzielt werden. Bei PS und PET stiegen die Werte über 72 mN/m und bei dem PET/PE-LD-Verbund auf etwa 36 mN/m. Dies bedeutet eine bessere Benetzbarkeit und Bedruckbarkeit der Oberflächen. Die Untersuchungen zur Sauerstoffdurchlässigkeit ergaben lediglich für den PET/PE-LD-Verbund eine signifikante Erhöhung von etwa 28%.

Rekapitulierend konnten an den behandelten Polymerfolien einige Veränderungen nachgewiesen werden, deren Ausmaß aber die Eigenschaften des Materials nicht maßgeblich verändern und vor allem die Funktionalität und Praxistauglichkeit nicht beeinträchtigen sollten. Die Auswahl der Plasmaparameter orientierte sich an der mikrobiziden Leistungsfähigkeit, d.h. es wurde keine Optimierung bzw. Abstimmung des Plasmas hinsichtlich möglicher Packstoffmodifikationen vorgenommen.

5.4 Zusammenfassung zur industriellen Umsetzbarkeit

Das Gebiet der Plasmatechnologie wird bereits seit einigen Jahren erforscht und viele Anwendungsmöglichkeiten (z.B. Oberflächenmodifikationen) haben den Sprung zur industriellen Umsetzung geschafft. Im Bereich der Plasmaentkeimung hingegen existieren bis jetzt nur Systeme für Batch-Prozesse, mit limitierter Probenzahl und relativ langen Behandlungszeiten. Bei Betrachtung der Vielzahl an publizierten wissenschaftlichen Ergebnissen zu diversen Plasmaanwendungen weltweit, finden sich sehr unterschiedliche Angaben zu der Entkeimungseffizienz und den Behandlungszeiten - von einigen Minuten bis zu mehreren Stunden (s. Kap. 1.2). Unter dem Begriff "Plasmasterilisation" werden in der Medizintechnik auch Verfahren angeboten, bei denen es sich um eine Kombination aus Wasserstoffperoxid und Plasma handelt. Die antimikrobielle Wirkung beruht dort größtenteils auf der oxidierenden Wirkung von Wasserstoffperoxid [AWAKOWICZ & KEIL, 2001].

Aufgrund der vielseitigen Wirkmechanismen und Synergieeffekte sind Plasmen eine effektive Methode für die sichere Entkeimung bzw. die Inaktivierung biologischer Moleküle auf Oberflächen im Lebensmittel-, Pharma- und Medizinbereich werden. Als nichtthermisches Verfahren eignen sie sich besonders für thermolabile Materialien wie diverse Kunststoffe.

Der derzeitige Stand der Dinge zeigt, dass die kaskadierte Barrierenentladung aus wissenschaftlicher Sicht für die industrielle Entkeimung (Keimreduktion) von Flachfolien hervorragend geeignet ist. Die empirischen Daten bestätigen der KDBE aber auch das Leistungsvermögen, sich als neues Sterilisationsverfahren in der Aseptik etablieren zu können. Ein Einsatz im Rahmen der Aseptik hängt letztendlich von den Anforderungen an die Entkeimungsleistung ab, die je nach Sterilisationsverfahren unterschiedlich sind und für Plasmaanlagen erst noch erarbeitet und standardisiert werden müssen. Die Ergebnisse mit dem Laborreaktor unterstreichen die hohe mikrobizide Effizienz gegenüber einem breiten Spektrum an Mikroorganismen (veg. Zellen, Endosporen). Als besonders widerstandsfähig haben sich in diesem Zusammenhang die Konidiosporen von A. niger erwiesen, weshalb sie sich als Modellorganismen für praktische Validierungen und Optimierungsvorhaben eignen. Letzteres kann relativ einfach durch Variation der Leistung, des Prozessgases oder des Excimer-Strahlers erreicht werden. Aufgrund der geometrischen Auslegung ist die kaskadierte Entladung für die kontinuierliche Entkeimung von flächigen Materialien wie Tiefziehfolien oder Deckelplatinen geeignet. Die einfache Bauweise und der Betrieb bei Atmosphärendruck ermöglichen eine Integration in bestehende Abfüllanlagen. Mit Anschaffungskosten in einem Bereich von etwa 60000 Euro liegt dieses System sicherlich in einem akzeptablen Preissegment und der Betrieb mit Luft als Prozessgas gewährleistet langfristig eine ökonomische Entkeimung. Eine reale Aussage über die Skalierbarkeit und das Verhalten unter praktischen Bedingungen ermöglicht nur der Einsatz im industriellen Maßstab. Deshalb ist es notwendig bestehende Plasmasysteme, wie die kaskadierte Barrierenentladung, in Abfüllanlagen

zu integrieren. Denn erst der Wissenstransfer zwischen Forschung und Industrie ermöglicht die Umsetzung von Laborgeräten in kommerzielle Industrieanlagen und begründet damit einen möglichen Erfolg der Plasmatechnologie als neuartiges Verfahren der Packstoffentkeimung.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Fachliteratur

ANSARI, MD. I., DATTA, A. K.: An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems. In: *Trans IChemE* Vol. 81 (2003), Part C, S. 57-65.

AWAKOWICZ, P.: *Plasmatechnologie*. München, Technische Universität, Fachbereich Elektrophysik, Vorlesung, 2003.

AWAKOWICZ, P.; DEILMANN, M. : Dicht und steril im Doppelpack – Plasmasterilisation von PET-Flaschen. In: *Metalloberfläche* 60 (2006), 5, S. 37-40.

AWAKOWICZ, P.; KEIL, G.: Sterilisation von Packstoffen, Hohlkörpern und thermolabilen medizinischen Materialien mit Niederdruckplasmen. In: *Vakuum in Forschung und Praxis* Heft 5 (2001), S. 294-299.

AWAKOWICZ, P., 2008: mündliche Mitteilung im Juni 2008

AZRAGUE, K.; BONNEFILLE, E.; PRADINES, V.; PIMIENTA, V.; OLIVEROS, E.; MAURETTE, M.T.; BENOIT-MARQUIE, F.: Hydrogen peroxide evolution during V-UV photolysis of water. In: *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4 (2005), S. 406-408.

BAIER, R.E.; CARTER, J.M.; SORENSEN, S.E.; MEYER, A.E.; MCGOWAN, B.D.; KASPRZAK, S.A.: Radiofrequency Gas Plasma (Glow Discharge) Disinfection of Dental Operative Instruments, Including Handpieces. In: *Journal of Oral Implantology*, 18 (1992), 3, S. 236-242.

BEAMAN, T. C.; GREENAMYRE, J.T.; CORNER, T.R.; PANKRATZ, H.S.; GERHARDT, P.: Bacterial spore heat resistance correlated with water content, wet density, and protoplast/sporoplast volume ratio. In: *Journal of Bacteriology* 150 (1982), 2, S. 870–877.

BUCHNER, N.: Verpackung von Lebensmitteln. 1. Aufl. Berlin: Springer-Verlag, 1999. – ISBN 3-540-64920-4.

CERF, O.: Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. In: Journal of Applied Bacteriology 42 (1977), S. 1-19.

CERNY, G.: Packstoffsterilisation beim aseptischen Abpacken. In: Internationale Zeitschrift für Lebensmittel-Technik, Marketing, Verpackung und Analytik (ZFL) 41 (1990), 1/2, S. 54-58.
CERNY, G.: Sterilisieren von Packstoffen für das aseptische Abpacken von Lebensmitteln mit Chemikalien, UV-Strahlen und Gamma-Strahlen. In: *Journal für Pharmatechnologie* 9 (1988), 3, S. 29-31.

CERNY, G.: Entkeimen von Packstoffen beim aseptischen Abpacken – Untersuchungen zur keimabtötenden Wirkung von UVC-Strahlern. In: *Verpackungs-Rundschau* 28 (1977), 10, S. 77-82.

CONRADS, H.; SCHMIDT, M.: Plasma generation and plasma sources. In: *Plasma Sources Science and Technology* 9 (2000), S. 441-454.

CZICHOS, H. : Hütte – Die Grundlagen der Ingenieurwissenschaften. 31. Aufl. Berlin: Springer-Verlag, 2000. ISBN 3-540-66882-9.

DIN 5031-7 (Hrsg., 1984): Strahlungsphysik im optischen Bereich. Benennung der Wellenlängenbereiche.

DIN 10082 (Hrsg., 1996): Packmittel – Buttereinwickler – Technische Lieferbedingungen.

DIN 53364 (Entwurf, 1986): Prüfung von Kunststoff-Folien. Benetzbarkeit von Folien.

DIN 53373 (Hrsg., 1970): Durchstoßversuch mit elektronischer Messwerteerfassung.

DIN 53375 (Hrsg., 1986): Bestimmung des Reibungsverhaltens.

DIN 53380-3 (Hrsg., 1998): Bestimmung der Gasdurchlässigkeit.

DOMININGHAUS, H.: *Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften*. 5. Aufl. Berlin: Springer Verlag, 1998. – ISBN 3-540-62659-X.

DRIKS, A.: Bacillus subtilis Spore Coat. In: *Microbiology and Molecular Reviews* 63 (1999), 1, S. 1-20.

ENGELHARD, P.: Inaktivieren von Mikroorganismen auf festen Oberflächen mittels Atmosphären aus feuchter Luft/Wasserstoffperoxid und IR-Behandlung. Freising, Technische Universität München-Weihenstephan, Dissertation, 2005.

FALKENSTEIN, Z.: The influence of ultraviolet illumination on OH formation in dielectric barrier discharges of Ar/O2/H2O: The JOSHI effect. In: *Journal of Applied Physics* 81 (1997a), 11, S. 7158-7162.

FALKENSTEIN, Z.: Influence of ultraviolet illumination on microdischarge behaviour in dry and humid N2, O2, air, and Ar/O2: The JOSHI effect. In: *Journal of Applied Physics* 81 (1997b), 9, S. 5975-5979. FALKENSTEIN, Z.: Surface cleaning mechanisms utilizing VUV radiation in oxygen containing gaseous environments. Ushio America, Inc., 2001.

FALKENSTEIN, Z.; COOGAN, J.J.: Microdischarge behaviour in the silent discharge of nitrogen-oxygen and water-air mixtures. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 30 (1997), S. 817-825.

Food and Drug Administration (FDA): Thermally processed low-acid foods packaged in hermetically sealed containers. In: *Code of Federal Regulations* 21, Vol. 2, Part 113 (2003). CITE: 21CFR113.

Food and Drug Administration (FDA): Standards for the Fabrication of Single Service Containers and Closures for Milk and Milk Products. 1999.

FROST & SULLIVAN: U.S. Aseptic Packaging Markets. Marketing Engineering Research (2005).

FRANKEN, O.; PIETSCH, G.; SAVELIEV, A.; HULKA, L.; NEIGER, M.; ROTH, M.; LIU, S.; SOLOSHENKO, I.; TSIOLKO, V.: *Grundlegende Erforschung plasmagestützter Verfahren zur Entkeimung von Packstoffen für Lebensmittel*. Aachen, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Forschungsbericht BMBF-Projekt FKZ 13N7609/9, 2003.

FUBMANN, G.: *Einführung in die Plasmaphysik*. Berlin, Humboldt-Universität, Vorlesung SS 2003.

HATCH, F.: Wissenschaftliche Nachrichten der Quarzlampen-Gesellschaft m.b.H. Hanau (1949), Bd. 1, Heft 2/3.

HALFMANN, H.; AWAKOWICZ, P.; BIBNOV, N.; WUNDERLICH, J.: A double inductively coupled plasma for sterilization of medical devices. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 40 (2007), S. 4145-4154.

HEISE, M, FRANKEN, O.: Crash-Kurs – Atmosphärendruckplasmen. Vortrag, Fraunhofer IVV, 2002.

HEISE, M.; LIERFELD T.; FRANKEN O.; NEFF W.: Single filament charge transfer and UV-emission properties of a cascaded dielectric barrier discharge (CDBD) set-up. In: *Plasma Sources Science and Technology* 13 (2004), S. 351-358.

HEISE, M.; NEFF, W.; FRANKEN, O.; MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.: Sterilization of Polymer Foils with Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure. In: *Plasmas and Polymers* 9 (2004), 1, S. 23-33.

HEISE, M.: Atmosphärendruckplasmen und die Anwendung zur Entkeimung von Polymerpackstoffen. Aachen, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Dissertation, 2005.

HEPING, L.; HONG, W.; ZHIYANG, S.; HUA, W.; CHAOYONG, Y.; SPERING, S.; WEIHONG, T.; ZUHONG, L.: TaqMan probe array for quantitative detection of DNA targets. In: *Nucleic Acid Researchs* 34 (2006), 1.

HOHMANN, H.J.; MÜNDERLEIN, W.: Abzugsgeschwindigkeiten für vertikale Schlauchbeutel mit Riemenabzug. In: *Internationale Zeitschrift für Lebensmittel-Technik, Marketing, Verpackung und Analytik* (ZFL) 40 (1989), 3, S. 120-130.

HOLZER, F.: Oxidation von organischen Verbindungen unter Nutzung von porösen und unporösen Feststoffen im nichtthermischen Plasma. Halle-Wittenberg, Universität, Dissertation, 2003.

HURY, S.; VIDAL, D.R.; DESOR, F.; PELLETIER, J.; LAGARDE, T.: A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas. In: *Letters in Applied Microbiology* 26 (1998), S. 417-421.

IGURA, N.; KAMIMURA, Y.; ISLAM, M.S.; SHIMODA, M.; HAYAKAWA, I.: Effects of minerals on resistance of Bacillus subtilis spores to heat and hydrostatic pressure. *Applied Environmental Microbiology* 69 (2003), 10, S. 6307-6310.

ILV-Merkblatt 33 (Hrsg., 1978): Bestimmung der Festigkeit von Heißsiegel-nähten – Quasistatische Methode. In: *Verpackungsrundschau* 29 (1978), 9.

International Dairy Federation (IDF): Technical Guide for the Packaging of Milk and Milk Products. Bulletin N° 300/1995 (Chapter 7: Hygiene), Brussels, 1995.

KESSLER, H. G.: Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik – Molkereitechnolgie. 4. Aufl. München: Verlag A. Kessler, 1996. – ISBN 3-9802378-4-2.

KLAGES, C. P.; EICHLER, M.: Beschichtung und Reinigung von Oberflächen mit Atmosphärendruck-Plasmen. In: *Vakuum in Forschung und Praxis* 14 (2002), 3, S. 149-155.

KLICHE, R.: Einfluss der Herstellungsbedingungen von *Bacillus subtilis* - Endosporen auf deren Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid zur Verwendung als Bioindikator. Freising, Fachhochschule Weihenstephan, Diplomarbeit, 2006.

KNIPPERS, R.: *Molekulare Genetik*. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1985. – ISBN3-13-477004-0.

KRÄMER, J.: Lebensmittelmikrobiologie. 4. Aufl. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 2002. – ISBN 3-8252-1421-4.

KUCHLING, H.: *Taschenbuch der Physik*. 17. Aufl. Leipzig: Fachbuchverlag Leipzig, 2001. – ISBN 3-446-21760-6.

KULOZIK, U.: Thermische Verfahren: Methoden und Kinetik der Keimreduktion und –inaktiverung in Lebensmitteln. In: *Chemie Ingenieur Technik* 78 (2006), 11, S. 1633-1645.

KUNZ, B.: *Grundriss der Lebensmittel-Mikrobiologie*. 1. Aufl. Hamburg: Behrs Verlag, 1988. – ISBN 3-925673-21-0.

LAROUSSI, M.; LEIPOLD, F.: Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. In: *International Journal of Mass Spectrometry* 233 (2004), S. 81-86.

LAROUSSI, M.; MENDIS, D.A.; ROSENBERG, M.: Plasma interaction with microbes. In: *New Journal of Physics* 5 (2003), S. 41.1-41.10.

LAROUSSI, M.: Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and Stateof-the-Art. In: *Plasma Processes and Polymers* 2 (2005), S. 391-400.

LEI, X.; RUI, Z.; PENG, L.; LI-LI, D.; RU-JUAN, Z.: Sterilization of *E. coli* bacterium with an atmospheric pressure surface barrier discharge. In: *Chinese Physics* 13 (2004), 6, S. 913-917.

LOTTSPEICH, F.; ZORBAS, H.: *Bioanalytik.* 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1998. – ISBN 3-8274-0041-4.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J.: *Brock Mikrobiologie*. 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2001. – 3-8274-0566-1.

MAEDA, Y.; IGURA, N.; SHIMODA, M.; HAYAKAWA, I.: Inactivation of *Escherichia* coli K12 Using Gas Plasma Produced from Humified Working Gas. In: Acta. Biotechnol. 23 (2003), 4, S. 389-395.

MELLY, E.; GENEST, P.C.; GILMORE, M.E.; LITTLE, S.; POPHAM, D.L.; DRIKS, A.; SETLOW, P.: Analysis of the properties of spores of Bacillus subtilis prepared at different temperatures. In: *Journal of Applied Microbiology* 92 (2002), 6, S. 1105-1115.

MENASHI, W.P.: Treatment of Surfaces. U.S. Patent No. 3,383,163, 1968.

MENDIS, D.A.; ROSENBERG, M.; AZAM, F.: A Note on the Possible Electrostatic Disruption of Bacteria. In: *IEEE Transactions on Plasma Science* 28 (2000), 4, S. 1304-1306.

MOISAN, M.; BARBEAU, J.; CREVIER, M.C.; PELLETIER, J.; PHILIPP, N.; SAOUDI, B.: Plasma sterilization - Methods and mechanisms. In: *Pure Applied Chemistry* 74 (2002), 3, S. 349-358.

MOISAN, M.; BARBEAU, J.; PELLETIER, J. u.a.: Plasma sterilization: Mechanisms, potential and shortcomings. In : *Le Vide : Sci.*, Techn. Applic. (numero Special: actes de colloque) (2001), S. 12-18.

MOISAN, M.; BARBEAU, J.; MOREAU, S.; PELLETIER, J.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L'H.: Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an

analysis of the inactivation mechanisms. In: *International Journal of Pharmaceutics* 226 (2001), S. 1-21.

MOREIRA, A. J.; MANSANO, R. D.; PINTO, T.; RUAS, R.; DA SILVA ZAMBON, L.; DA SILVA, M. V.; VERDONCK, P. B.: Sterilization by oxygen plasma. In: *Applied Surface Science* 235 (2004), S. 151-155.

MUNZERT, P: Entwicklung von Vakuumbeschichtungsprozessen für die Entspiegelung von Polymethylmethacrylat. Halle-Wittenberg, Universität, Dissertation, 2004.

MURANYI, P.: Anfertigung verschiedener Inaktivierungskinetiken bei der Entkeimung von Packstoffen mit einem kombinierten UV-Plasmaverfahren. Freising, Technische Universität München, Masterarbeit, 2003.

MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.; DOBOSZ, M.: Sterilisation von Abfüllmaschinen: Standardisierung von Bioindikatoren, Untersuchungsmethoden und Validierungsverfahren. In: *Chemie Ingenieur Technik* 78 (2006), 11, S. 1667-1673.

NELSON, J.: Ultraviolet disinfection. In: Health Estate Journal 44 (1990), 1, S. 8-10.

NEWTON, C.R.; GRAHAM, A.: *PCR*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1994. – ISBN 3-8274-0190-9.

NICHOLSON, W.L.: Photoreactivation in the Genus *Bacillus*. In: *Current Microbiology* 31 (1995), S. 361-364.

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N; HORNECK, G; MELOSH, H.J.; SETLOW, P.: Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (2000), 3, S. 548-572.

OPPENLÄNDER, T.: Potentials and Applications of Excimer Lamps (Incoherent Vacuum-UV/UV Sources) in Photochemistry and in Photochemical Technology. Furtwangen, University of Applied Sciences, Internet Veröffentlichung, 2003.

PARDEY, K. K.; SCHUCHMANN, H.P., SCHUBERT, H.; HEINZ, V., KNORR, D.: Wie gut sind unsere Entkeimungsverfahren? Abtöten von Mikroorganismen als stochastischer Vorgang. In: *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005a), 8, S. 1186-1188.

PARDEY, K.K.; SCHUCHMANN, H.P.; SCHUBERT, H.: Modellierung der thermischen Inaktivierung vegetativer Mikroorganismen. In: *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005b), 7, S. 841-852.

PELEG, M.; COLE, M.B.: Reinterpretation of Microbial Survival Curves. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38 (1998), 5, S. 353-380.

PELEG, M.; COLE, M.B.: Estimating the Survival of *Clostridium botulinum* Spores during Heat Treatments. In: *Journal of Food Protection* 63 (2000), 2, S. 190-195.

PELEG, M.; PENCHINA, C. M.: Modeling Microbial Survival during Exposure to a Lethal Agent with Varying Intensity. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40 (2000), 2, S. 159-172.

PFLUMM, C.; NEIGER, M.: Erforschung neuer homogener atmosphärischer Plasmen und ausgewählter Anwendungen. Teilvorhaben: Modellierung der homogenen transienten Barrierenentladung. Karlsruhe, BMBF-Abschlußbericht, FKZ 13N7352/1, 2003

PICHHARDT, K.: Lebensmittelmikrobiologie – Grundlagen für die Praxis. 2. Aufl. Berlin: Springer-Verlag, 1989. – ISBN 3-540-50285-8.

PIRINGER, O.G.; BANER, A.L.: *Plastic Packaging Materials for Food – Barrier Function, Mass Transport, Quality Assurance and Legislation.* 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000. – ISBN 3-527-28868-6.

PRINCE, H.N.: Stability of *Bacillus pumilus* spore strips used for monitoring radiation sterilization. In: *Applied Environmental Microbiology* 31 (1976), S. 999-1000.

PUREVDORJ, D.; IGURA, N.; SHIMODA, M.; ARIYADA, M.; HAYAKAWA, O.: Kinetics of Inactivation of Bacillus Spores Using Low Temperature Argon Plasma at Different Microwave Power Densities. In: *Acta Biotechnology*, 21 (2001), 4, S. 333-342.

PUREVDORJ, D.; IGURA, N.; HAYAKAWA, I.; ARIYADA, O.: Inactivation of *Escherichia coli* by microwave induced low temperature argon plasma treatment. In: *Journal of Food Engineering* 53 (2002), S. 341-346.

PUREVDORJ, D.; IGURA, N.; ARIYADA, O.; HAYAKAWA, I.: Effect of feed gas composition of gas discharge plasmas on *Bacillus pumilus* spore mortality. In: *Letters in Applied Microbiology* 37 (2003), S. 31-34.

RABALLAND, V.; BENEDIKT, J.; VON KEUDELL, A.; WUNDERLICH, J.: Inactivation of *Bacillus atrophaeus* and of *Aspergillus niger* using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 41 (2008), S. 2826–2830.

RAMAIAH, N.A.; KHOSLA, B.D.; GAUR, H.C.: Influence of Surface Films on JOSHI Effect in Water Vapour. In: *Die Naturwissenschaften* 42 (1955), 17, S. 484-485.

RAMSAY, I. A.; NIEDZIELA, J.C.; OGDEN, I.D.: The synergistic effect of Excimer and Low-Pressure Mercury Lamps on the Disinfection of Flow Water. In: *Journal of Food Protection* 63 (2000), 11, S. 1529-1533.

REUTER, H.: Aseptisches Verpacken von Lebensmitteln – Grundlagen und Stand der Technik. In: *Chemie Ingenieur Technik* 58 (1986), S. 785-793. *Römpp Lexikon Chemie*. Band 3. 10. überarbeitete Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1997.

Römpp Lexikon Chemie. Band 5. 10. überarbeitete Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1998.

RÜCKAUF, A.: Zur Entladungscharakteristik und Stoffwandlung im nicht-thermischen *Plasma des ferroelektrischen Schüttungsreaktors.* Halle-Wittenberg, Universität, Dissertation, 2002.

SCHEUBERT P. : Crashkurs "Plasmatechnologie". Freising, Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung, Vortrag, 2001.

SCHLEGEL, H. G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. überarbeitete Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1992. – ISBN 3-13-444607-3

SCHLEICHER, E.: Über den Reaktionsmechanismus der DNA-Photolyase. München, Technische Universität, Diss., 2002.

SETLOW, P.: Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. In: *Journal of Applied Microbiology* 101 (2006), S. 514-525.

STOFFELS, E.; KIEFT, I. E.; SLADEK, R. E.J. u.a.: Gas Plasma Treatment: A New Approach to Surgery. In: *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 32. Jg. (2004), S. 427-460.

SUBRAMANYAM, T.K.; SCHWEFEL, R.; AWAKOWICZ, P.: Plasma sterilization and correlation to plasma diagnostics. In: *Le Vide* 303 (2002), S. 169-174.

TAMM, U.: Beseitigung von organischen Schadstoffen in Abgasen durch Oxidation mit Ozon. Halle-Wittenberg, Universität, Diss., 2002.

TEICHMANN, W., 2007: mündliche Mitteilung im Februar 2007

TETZNER, R.: *Entwicklung von Realtime-PCR-Methoden zur Analyse von DNA-Methylierung*. Saarbrücken, Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Dissertation, 2006.

TROMPETER, F.-J.: Barrierenentladungen zum Abbau von Schadstoffen in motorischen Verbrennungsgasen. Aachen, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Dissertation, 2001.

TROMPETER, F.-J.; NEFF, W.; FRANKEN, O.; HEISE, M.; NEIGER, M.; LIU, S.; PIETSCH, G.J.; SAVELJEW, A.B.: Reduction of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* spores using nonthermal atmospheric gas discharges. In: *IEEE Transactions on Plasma Science* 30 (2002), 4, S. 1416-1422.

VDMA (Hrsg., 2006): Aseptische Verpackungsmaschinen für die Nahrungsmittelindustrie – Mindestanforderungen und Rahmenbedingungen für einen bestimmungsgemäßen Betrieb. In: *VDMA-Einheitsblatt* Nr. 8742, 11 (2006).

VDMA (Hrsg., 2002): Prüfung von Aseptikanlagen mit Packmittelentkeimungsvorrichtungen auf deren Wirkungsgrad. VDMA-Merkblatt,2002/ Nr. 6.

VDMA (Hrsg., 2000): Hygienische Abfüllmaschinen für flüssige und pastöse Nahrungsmittel – Kategorisierung und typische Anwendungsfelder. In: *VDMA-Fachverbandsschrift* 2 (2000).

VDMA (Hrsg., 1999): Kriterien zur Qualitätsbeurteilung von Packstoffen zur Verarbeitung auf Siegelrand- und Schlauchbeutel- Form-, Füll- und Verschließmaschinen und -anlagen – Mindestanforderungen. In: *VDMA-Einheitsblatt* Nr. 8748 (1999).

VON KEUDELL, A.; OPRETZKA, J.; BENEDIKT, J.; AWAKOWICZ, P.; WUNDERLICH, J.: The role of chemical sputtering during plasma sterilization of *Bacillus atrophaeus*. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 40 (2007), S. 2826–2830.

WALLHÄUBER, K. H.: *Praxis der Sterilisation-Desinfektion-Konservierung - Keimidentifizierung-Betriebshygiene*. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1988. – ISBN 3-13-416304-7.

WARRINER, K.; RYSSTA, G.; MURDEN, A.; RUMSBY, P.; THOMAS, D.; WAITES, W.M.: Inactivation of *Bacillus subtilis* spores on packaging material by u.v. excimer laser irradiation. In: *Journal of Applied Microbiology* 88 (2000), S. 678-685.

WILKE, B.: Validierung einer Aseptikanlage. In: Internationale Zeitschrift für Lebensmittel-Technik, Marketing, Verpackung und Analytik (ZFL) 1/2 (1996), S. 24-27.

WINK, M.; WEHRLE, H.: *PCR im medizinischen und biologischen Labor – Handbuch für den Praktiker*. 1. Aufl. Darmstadt: GIT Verlag GmbH, 1994. – ISBN 3-928865-13-7.

YASBIN, R.E.: DNA repair in *Bacillus subtilis*. In: DUBNAU, D.A.: *The molecular biology of bacilli*. *Volume II*. New York : Academic Press, 1985. – ISBN-10: 0122227026.

6.2 Eigene Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge zur Plasmaentkeimung

FRANKEN, O.; HEISE, M.; MURANYI, P.; NEFF, W.; PIETSCH, G.J.; SAVELIEV, A.B.; WUNDERLICH, J.: Influence of homogeneity of dielectric barrier discharges at atmospheric pressure on spore inactivation. 16th International Symposium on Plasma Chemistry, Taormina, Italy 2003.

HEISE, M.; NEFF, W.; FRANKEN, O.; MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.: Sterilization of Polymer Foils with Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure. In: *Plasma and Polymers* 9 (2004), 1, S. 23-33.

MURANYI, P.: Plasma sterilization: Mechanisms and Feasibility for Application at Aseptic Processing. Aseptipak-Europe, Frankfurt (2004).

MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.: PET-Entkeimung: Plasma eine zündende Innovation. In: *Brauwelt* 48 (2004), S. 101-103.

MURANYI, P.: Plasma-Technologie für das Entkeimen von Packstoffmaterialien. Technlogie-Seminar, TUM Weihenstephan (2005).

MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.: Plasma sterilisation – a brilliant innovation. In: *Brauwelt International* 23 (2005), 5, S. 338-340.

MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.: Entkeimte Packstoffe - Verbesserte Hygiene durch Gas-Plasma. In: *Verpackungs-Rundschau* 1 (2005), S. 39-43.

MURANYI, P.; LANGOWSKI, H.C.; WUNDERLICH, J.: Plasmatechnologie – Neue Wege zur Entkeimung von Packstoffmaterialien. In: *Chemie Ingenieur Technik* 78 (2006), 11, S. 1697-1706.

MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.; HEISE, M.: Sterilization efficiency of a cascaded dieletric barrier discharge. In: *Journal of Applied Microbiology* 103 (2007), S. 1535-1544.

MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.; HEISE, M.: Influence of relative gas humidity on the inactivation efficiency of a low temperature gas plasma. In: *Journal of Applied Microbiology* – angenommen.

SCHNEIDER, J.; FEICHTINGER, J.; KRÜGER, J.; MURANYI, P.; SCHULZ, A.; WALKER, M.; WUNDERLICH, J.; SCHUMACHER, U.: Sterilization of food packaging materials by low-pressure microwave plasmas. 16th International Symposium on Plasma Chemistry, Taormina, Italy 2003.

SCHNEIDER, J.; BAUMGÄRTNER, K.M.; FEICHTINGER, J.; KRÜGER, J.; MURANYI, P.; SCHULZ, A.; WALKER, M.; WUNDERLICH, J.; SCHUMACHER, U.: Investigation of the practicability of low-pressure microwave plasmas in the sterilisation of food

packaging materials at industrial level. In: Surface & Coatings Technology 200 (2005), S. 962-966.

WUNDERLICH, J.; MURANYI, P.: Packstoffentkeimung – Die Kraft des Plasmas. In: *Lebensmitteltechnik* 36 (2003), 6, S. 48.

6.3 Internetquellen

DPG (Deutsche physikalische Gesellschaft): Plasmaphysik. URL http://www.dpg-physik.de/gliederung/fv/p/info/geschichte.html Aktualisierungsdatum: 11.05.2006

Graphics Gallery URL http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ Aktualisierungsdatum: 22.11.2006

Wikipedia: Cell Wall URL http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_wall Aktualisierungsdatum 15.08.2006

7 Anhang

7.1 Rezepturen von Nährlösungen und Nährböden

Alle Angaben in g/l demineralisierten Wasser. Die Zutaten wurden von der Fa. Merck und Oxoid bezogen.

PCA-Agar (Fa. Merck)

YGC-Agar (Fa. Merck)

Pepton aus Casein	5,0	Hefeextrakt	5,0
Hefeextrakt	2,5	D(+)-Glucose	20,0
D(+)-Glucose	1,0	Chloramphenicol	0,1
Agar-agar	14,0	Agar-Agar	14,9
pH = 7,0	,	pH = 6, 6	, ,
Sterilisieren 121°C, 15 min		Sterilisieren 121°C, 15 min	

CASO-Bouillon (Fa. Merck)

Fleisch-Leber-Agar (Fa. Merck)

Pepton aus Casein	15,0	Fleisch-Leber-Basis	
Pepton aus Sojamehl	5,0	D(+)-Glucose	0,75
Natriumchlorid	5,0	Stärke	0,75
Agar-Agar	15,0	Natriumsulfit	1,2
pH = 7,3		Ammoniumeisen-III-Citrat	0,5
Sterilisieren 121°C, 15 min		Agar-Agar	11,0
		pH = 7,6	
		Sterilisieren 121°C, 15 min	

Nährbouillon (Fa. Merck)

Hirn-Herz-Agar (Merck)

Ringerlösung (Tabletten/ Oxoid)

Pepton aus Fleisch	5,0	Natriumchlorid	2,25
Fleischextrakt	3,0	Kaliumchlorid	0,105
pH = 7,0		Calciumchlorid	0,12
Sterilisieren 121°C, 15 min		Natriumkarbonat	0,05
		pH = 6,9	
		Sterilisieren 121°C, 15 min	

RCM-Agar (Merck)

Nährsubstrat	27,5
D(+)-Glucose	2,0
Natriumchlorid	5,0
di-Natriumhydrogenphosphat	2,5
Agar-Agar	15,0
pH = 7,4	
Sterilisieren 121°C, 15 min	

Fleischextrakt	10,0
Pepton aus Casein	10,0
Hefeextrakt	3,0
D(+)-Glucose	5,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Natriumacetat	3,0
L-Cysteiniumchlorid	0,5
Agar-Agar	12,5
pH = 6,8	
Sterilisieren 121°C, 15 min	

7.2 Rezepturen von Pufferlösungen

Laufpuffer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (25 ml)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (0,5 mol/l)	500 µl
Ethylendiamintetraacetat (0,1 mol/l)	250 µl
Xylen-Cyanol-Lösung (1%)	1,25 ml
Bromphenolblau	10 mg
dest. Wasser	23 ml
pH-Wert mit Essigsäure auf 7,5 einstellen	

7.3 Tabellen

Tabelle 10: Inaktivierung der Endosporen von *B. atrophaeus* bei unterschiedlichen Prozessgasen, in Abhängigkeit von der Behandlungszeit (KDBE 282 nm, Leistung: ca. 200 W).

	Abtötung log ₁₀ (N ₀ /N)					
Prozessgas	Zeit [s]					
	0,6	0,9	1,8	3,0	4,8	
Umgebungsluft	4,5	4,9	5,6	5,0	4,6	
synth. Luft	2,6	4,3	4,3	4,9	5,0	
Sauerstoff	2,2	3,4	4,6	4,4	5,7	
Stickstoff	2,9	4,6	4,9	5,3	5,7	
Argon	4,1	4,7	4,8	5,0	5,4	

Tabelle 11: Inaktivierung der Konidiosporen von *A. niger* DSM 1957 bei unterschiedlichen Prozessgasen, in Abhängigkeit von der Behandlungszeit (KDBE 282 nm, Leistung: ca. 200 W).

	Abtötung log ₁₀ (N ₀ /N)					
Prozessgas	Zeit [s]					
	0,6	0,9	1,8	3,0	4,8	
Umgebungsluft	5,1	5,9	5,2	5,9	5,5	
synth. Luft	0,1	0,7	1,3	2,6	3,6	
Sauerstoff	0,4	0,5	1,0	0,2	4,0	
Stickstoff	0,2	0,3	0,2	3,0	3,2	
Argon	2,8	4,0	5,2	5,6	5,9	

Testkeim	Na	Ν		Abtötung log ₁₀ (N ₀ /N)		
	140	Ze	eit [s]	Zei	Zeit [s]	
		1	3	1	3	
Salm. mons (gram-)	1,5e+6	< 3,3e-1	< 3,3e-1	>6,7	>6,7	
Staph. aureus (gram+)	2,9e+6	< 3,3e-1	< 3,3e-1	>6,9	>6,9	
E. coli (gram-)	7,5e+5	1,7e+0	3,3e-1	5,6	6,4	
D. radiodurans (gram+)	1,3e+6	< 3,3e-1	3,3e-1	>6,6	6,6	

Tabelle 12: Darstellung der mittleren Anfangs- und Endkeimzahlen verschiedener vegetativer Bakterien und der daraus resultierenden Inaktivierung bei 1 bzw. 3 s Behandlungszeit (KDBE 282 nm, Leistung: ca. 130 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Tabelle 13: Darstellung der mittleren Anfangs- und Endkeimzahlen verschiedener bakterieller Sporenbildner, als auch von *A. niger* DSM 1957, und der daraus resultierenden Inaktivierung bei 1 bzw. 3 s Behandlungszeit (KDBE 282 nm, Leistung: ca. 130 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Testkeim	Na	Ν		Abtötung log ₁₀ (N ₀ /N)		
	10	Ze	eit [s]	Ze	Zeit [s]	
		1	3	1	3	
B. atrophaeus	9,7e+6	8,3e+1	3,6e+1	5,1	5,4	
B. pumilus	9,7e+5	3,3e+0	2,0e+0	5,5	5,7	
Cl. botulinum Typ A	3,7e+5	3,3e-1	< 3,3e-1	6,1	>6,1	
Cl. sporogenes	2,9e+6	1,5e+1	5,4e+0	5,3	5,7	
A. niger	1,1e+6	1,1e+3	1,8e+2	3,0	3,8	

Behandlungsdauer [s]	$\log_{10} (N_0/N)$				
	rel. Gasfeuchte [%]				
	0	70	80		
1	$0,7 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	0,8 ± 0,0		
3	$1,0 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$		
5	$1,2 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,4$		
7	1,4 ± 0,3	$3,3 \pm 0,4$	2,6 ± 0,4		

Tabelle 14: Mittlere Inaktivierung der Konidiosporen von *A. niger* DSM 1957 bei 0%, 70% und 80% relativer Luftfeuchte, in Abhängigkeit von der Behandlungszeit (KDBE 282 nm, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Tabelle 15: Mittlere Inaktivierung der Konidiosporen von *A. niger* DSM 1957 bei 0%, 65%, 70% und 75% relativer Luftfeuchte, in Abhängigkeit von der Behandlungszeit (KDBE 282 nm, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Behandlungsdauer [s]	$\log_{10} (N_0/N)$					
	rel. Gasfeuchte [%]					
	0	65	70	75		
1	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,4	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,2		
3	$1,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,0$		
5	$2,0 \pm 0,0$	$2,0 \pm 0,1$	3,1 ± 0,2	$4,0 \pm 0,4$		
7	2,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	$4,0 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,5$		

Behandlungsdauer [s]	log ₁₀ (N ₀ /N) Gasfeuchte [%]	
	0	80
1	4,7 ± 0,3	2,6±0,3
3	$5,1 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,7$
5	$5,0 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,1$
7	$4,9 \pm 0,2$	4,4 ± 0,2

Tabelle 16: Mittlere Inaktivierung der Endosporen von *Bacillus subtilis* DSM 4841 bei 0% und 80% relativer Luftfeuchte in Abhängigkeit, von der Behandlungszeit (KDBE 282 nm, Leistung: ca. 180 W, Prozessgas: Umgebungsluft).

Curriculum vitae

Peter Muranyi

07. März 1977	geboren in Freising
1983-1989	Grund- und Teilhauptschule Vötting, Freising
1989-1993	Karl-Meichelbeck-Realschule, Freising
1993-1995	Fachoberschule Freising
1995-2000	Studium der Lebensmitteltechnologie (FH) an der Technischen Universität München-Weihenstephan (TUM)
2000	DiplIng. (FH) in Lebensmitteltechnologie
2000-2001	wissenschaftliche Hilfskraft am Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV), Freising
2001-2003	Aufbaustudium der Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel an der TUM-Weihenstephan
2003	M. Sc. (TUM) in Lebensmitteltechnologie und Biotechnologie der Lebensmittel
2003-2007	Doktorand am Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV), Freising
seit 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer IVV