



Neues Gymnasium Bochum
- Europaschule in NRW -
Querenburger Straße 45
44789 Bochum

Inaktivierung von Bakterien durch Wasserstoffperoxid mit Hilfe eines nichtthermischen Plasmas generiert durch eine Dielektrische Barriereentladung

vorgelegt im Fach	<i>Biologie</i>
von	<i>Gina Rex</i>
im Schuljahr 2019/2020	
Abgabetermin	<i>13.03.2020</i>
Betreuungslehrer/in	<i>Frau C. Wagner</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
2.	Theoretische Grundlagen: Plasmazustand	4
3.	Allgemeine Funktionsweise einer dielektrischen Barriereentladung	4
4.	Experiment	5
4.1.	Analyseverfahren	5
4.1.1.	UV/VIS-Spektroskopie	5
4.1.2.	pH-Teststreifen	5
4.1.3.	Wasserstoffperoxid-Test	5
4.2.	Versuchsaufbau	5
4.2.1.	Material	5
4.2.2.	Durchführung	6
4.3.	Ergebnisse	6
4.4.	Fehlerdiskussion	8
5.	Inaktivierung von Bakterien durch Wasserstoffperoxid	10
5.1.	Oxidativer Stress	10
5.2.	pH-Homöostase	12
5.3.	Anwendungsmöglichkeit: Behandlung von chronischen Wunden	12
6.	Fazit	14
7.	Ausblick	14

1. Einleitung

Im Universum besteht 99 Prozent der leuchtenden Materie aus Plasma. Auf der Erde tritt der natürliche Plasmazustand nur unter bestimmten Bedingungen auf. Das typische Leuchten durch eine Plasmaentladung zeigt sich in den Naturphänomenen, wie Blitzen und Polarlichtern. Dennoch kann ein Plasma durch eine Gasentladung künstlich erzeugt werden und so technisch angewendet und nutzbar gemacht werden. Seit der, in den 1990er¹ entwickelten Möglichkeit auch nichtthermisches, kaltes Plasma zu erzeugen, haben sich neue Anwendungsbereiche von Plasmen eröffnet. Neben der Nutzung in der Lebensmitteltechnologie oder der Reinigung von Industrieabwässern hat sich die Plasmamedizin entwickelt. Unter den möglichen Anwendungsgebieten befindet sich die Desinfektion und Sterilisation von chirurgischen Instrumenten und Medizinprodukten aber auch die therapeutische Anwendung zur Förderung von Wundheilungsprozessen, insbesondere bei chronischen Wunden¹, wobei sich die Plasmabehandlung als schmerzfreie Behandlungsmethode bestätigt hat. Dabei wirkt das kalte Plasma auf Bakterien, Viren und Pilze. Davon nicht ausgeschlossen sind auch antibiotikaresistente Bakterienstämme wie Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA-Stämme)², der trotz rückläufiger Tendenzen immer noch ein gegenwärtiges Problem in der ambulanten und stationären Versorgung darstellt³. Jedes Jahr erkranken in Deutschland ungefähr 400.000 bis 600.000 Menschen an nosokomialen Infektionen (Krankenhausinfektionen). Das Bundesministerium für Gesundheit teilte eine Sterberate von 10.000 bis 20.000 Menschen pro Jahr mit⁴. Dadurch stehen alternative Desinfektions- und Sterilisationsmethoden zunehmend im Vordergrund. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der biologischen Analyse der Wechselwirkung von Wasserstoffperoxid auf Bakterien. Durch das Experiment soll die Entstehung von Wasserstoffperoxid in destilliertem Wasser bei einer Plasmabehandlung überprüft werden und die Abhängigkeit zu der Behandlungsdauer analysiert werden. Das destillierte Wasser soll dabei das umgebende Milieu der Bakterien bei der gegebenen Feuchtigkeit auf der Haut und in chronischen Wunden simulieren.

¹ Hans-Robert Metelmann, Thomas von Woedtke und Klaus-Dieter Weltmann, Plasmamedizin Kaltplasma in der Medizinischen Anwendung (Berlin: Springer Berlin, 2016, S. 19)

² Hans-Robert Metelmann, Thomas Von Woedtke, and Klaus-Dieter Weltmann, Plasmamedizin Kaltplasma in Der Medizinischen Anwendung (Berlin: Springer Berlin, 2016, S.57f.)

³ Bundesgesundheitsministerium, abgerufen am 8. März 2020, <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/infektionskrankheiten.html>

⁴ Bundesgesundheitsministerium, abgerufen am 7. März 2020, <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/fragen-und-antworten.html>

2. Theoretische Grundlagen: Plasmazustand

Der Plasmazustand ist bekannt als der vierte Aggregatzustand. Diese Bezeichnung bezieht sich auf die Veränderung der Materie bei steigender Temperatur (s. Abb. 1a, 1b, Anhang S.17). Im festen Aggregatzustand sind alle Atome regelmäßig angeordnet und schwingen um ihre eigene Achse. Im flüssigen Zustand sind die Atome oder Moleküle wechselseitig beweglich. Im gasförmigen Zustand sind die Atome oder Moleküle weit voneinander entfernt und bewegen sich vorwiegend frei im Raum. Durch das Hinzufügen weiterer Energie wird eine Ionisation hervorgerufen. Dabei erreicht das Gas den Plasmazustand. Die neutralen Atome oder Moleküle werden in ihre Valenzelektronen und Ionen aufgespalten. Somit verliert das Gas seine Eigenschaft elektrisch neutral zu sein. Folglich enthält ein Plasma auf Teilchenebene freie Ladungsträger und je nach Ionisationsgrad die sogenannten schwereren Spezies wie Moleküle, Atome und Ionen. Es ist also ein ionisiertes Gas.

Ein Plasma lässt sich nach verschiedenen Eigenschaften wie Temperatur, Dichte, Druck und vorhandener Spezies kategorisieren. In der Plasmamedizin wird zur Behandlung auf der Haut hauptsächlich das nichtthermische Plasma verwendet, das umgangssprachlich auch als „kaltes Plasma“ bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um ein Plasma, das sich nicht im thermischen Gleichgewicht befindet. Das heißt, dass die Temperatur der Elektronen weitaus höher ist als die der schweren Spezies, wodurch das Plasma nur die Raumtemperatur erreichen kann⁵.

3. Allgemeine Funktionsweise einer dielektrischen Barriereentladung

Die dielektrische Barriereentladung (DBD, engl.: dielectric barrier discharge) generiert nichtthermische Atmosphärendruckplasmen, wobei mindestens eine Elektrode durch ein Dielektrikum vom Prozessgas getrennt ist. Das Dielektrikum ist die Voraussetzung dafür, dass ein kaltes Plasma entsteht. Es handelt sich dabei um ein nicht oder schlecht leitendes Material: Feststoff, Flüssigkeit oder Gas. Hier zu nennen sind Quarz, Keramik oder Glas. Um das neutrale Gas bei Atmosphärendruck in den Plasmazustand zu überführen, wird Energie in Form von gepulster oder hochfrequenter Wechselspannung mit einer Frequenz von 50 Hz bis 100 kHz genutzt⁶. Dabei werden während der kurzen Entladungsdauer nur die Elektronen beschleunigt und keine Ladungsträger der schweren Spezies (Ionen), wodurch die Gastemperatur nahe der Raumtemperatur bleibt⁵ und damit eine direkte Behandlung mit nichtthermischem Plasma auf der Haut möglich ist.

⁵ Alexander A. Fridman, Plasma Chemistry (Cambridge: Cambridge University Press, 2012, S.1-5)

⁶ Alexander A. Fridman, Plasma Chemistry (Cambridge: Cambridge University Press, 2012, S.239)

4. Experiment

4.1. Analyseverfahren

4.1.1. UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie ist eine Form der Molekularspektroskopie. Aufgrund unterschiedlicher Absorptionsspektren von Elementen lassen sich diese in einer Probe identifizieren. In dieser Arbeit wird die UV/VIS-Spektroskopie dazu genutzt, um die maximale optische Dichte/Intensität (im Bereich von 400-500 nm) von den unterschiedlichen Proben zu ermitteln. Damit kann über die Kalibrierungskurve der Gehalt von Wasserstoffperoxid berechnet werden.

Dafür wird das CHEMUSB4-UV-VIS-Spektralphotometer der Firma Ocean Optics verwendet.

4.1.2. pH-Teststreifen

Der pH-Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Konzentration der Hydroniumionen (H_3O^+) in einer Lösung, wodurch eine saure, neutrale und alkalische Lösung gekennzeichnet wird. In dieser Arbeit werden wegen des geringen Volumens der Proben, Teststreifen verwendet.

4.1.3. Wasserstoffperoxid Test

Der Wasserstoffperoxid-Test wird verwendet, um die Proben anzufärben. Hierbei wurde der Wasserstoffperoxid Test der Firma Spectroquant genutzt. Die Messweite dieses Tests beträgt 0.015 – 6.00 mg/L H_2O_2 und nutzt Neocuporin als chemische Methode.

4.2. Versuchsaufbau- Plasmareaktion mit destilliertem Wasser

4.2.1. Material-Aufbau der verwendeten DBD

In dem Versuch arbeitet die Plasmaquelle unter Atmosphärendruck und mit Luft als Prozessgas. Es handelt sich um eine Kupferelektrode, die durch eine Aluminiumoxidschicht galvanisch von dem Prozessgas Luft getrennt ist. Diese wird mit 18 kV und einer Frequenz von 1 kHz getrieben. Der Abstand der getriebenen Elektrode zur Probe beträgt 1 mm (s. Abb. 2-3, Anhang S.17).

Zusätzliche Materialien: destilliertes Wasser (A.dest.), Natronlauge (NaOH) 0,02 mol/L, 30 prozentiges Wasserstoffperoxid (volumenbezogene Angabe)

4.2.2. Durchführung

1. H₂O₂-Verdünnungsreihe erstellen

Es wird eine Verdünnungsreihe aus sechs Proben erstellt:

- 1mg /µl: 4,5 µl H₂O₂ und 1495,5 µl A.dest.
- 2mg /µl: 9,0 µl H₂O₂ und 1491 µl A.dest.
- 3mg / µl: 13,5 µl H₂O₂ und 1486,5 µl A.dest.
- 4mg / µl: 18,0 µl H₂O₂ und 1482 µl A.dest.
- 5mg / µl: 22,5 µl H₂O₂ und 1477,5 µl A.dest.
- 6mg / µl: 27,0 µl H₂O₂ und 1473 µl A.dest.

1.1 Kalibrierkurve der verdünnten sechs Proben messen

2. Plasmabehandlung von destilliertem Wasser

2.1 80 µl A.dest. in Abhängigkeit der Zeit (1 min, 2 min, 5 min) mit Plasma behandeln, pH-Wert der restlichen 30 µl messen

2.2 50 µl der behandelten Probe entnehmen und 5 µl NaOH sowie 5,5 µl der H₂O₂ Tester hinzugeben

2.3 Probe 10 min inkubieren lassen

2.4 Zur Probe werden 334 µl A.dest. hinzugegeben

2.5 Anschließende Kalibrierung der Probe

Um den Wasserstoffperoxidgehalt zu bestimmen, wird zunächst der bekannte Wasserstoffperoxidgehalt von 1-6 mg/µl gegen die optische Dichte (Maximale Intensität im Bereich von 400-500 nm) dieser Proben grafisch dargestellt und die Funktion der Kalibrierkurve berechnet. Danach müssen die Werte der optischen Dichte der behandelten Proben in die Funktion eingesetzt werden. Somit können die unterschiedlichen Wasserstoffperoxidgehalte berechnet und in einem Diagramm in Abhängigkeit von der Behandlungszeit graphisch dargestellt werden.

4.3. Ergebnisse

Bei einer Plasmareaktion mit Luft als Prozessgas kommt es zu einer Wechselwirkung mit Atomen und Molekülen aus der Luft. Dabei entstehen verschiedene reaktive Spezies wie UV-Photonen und kurzlebige Stickstoff- und Sauerstoff-Spezies (RNOS), wie Stickstoffmonoxid (NO), atomarer Sauerstoff (O), Ozon (O₃) und Hydroxyl-Radikale (\cdot OH) sowie langlebige Spezies, wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Stickstoffdioxid (NO₂) und Nitrate (NO₃)⁷. Das Wasserstoffperoxid wird durch eine Plasma-Wasser-Wechselwirkung erzeugt⁸ und fungiert als Edukt für die Bildung weiterer RNOS .

⁷ Yukinori Sakiyama et al., „Plasma Chemistry Model of Surface Microdischarge in Humid Air and Dynamics of Reactive Neutral Species,” Journal of Physics D: Applied Physics 45, no. 42 (January 2012)

⁸ Jiandi Liu et al., „Direct Synthesis of Hydrogen Peroxide from Plasma-Water Interactions” Nature News (Nature Publishing Group, December 5, 2016), <https://www.nature.com/articles/srep38454>

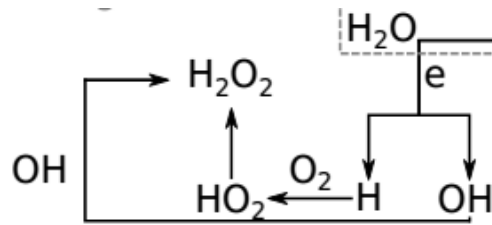


Abb. 4 Teilreaktion von Wasser bei einer Plasmabehandlung⁹

Bei der Synthese von Wasserstoffperoxid sind Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) eine maßgebliche Spezies, die auch bei vielen weiteren Reaktionen der RNOS erzeugt werden⁸. Mögliche Reaktion der Wasserstoffperoxidsynthese sind (s. Abb.4):

$\text{OH} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ und $\text{HO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ ¹⁰. Bei dem Versuch wurde festgestellt, dass es bei einer steigenden Behandlungsdauer ebenfalls zu einem Anstieg des Wasserstoffperoxidgehaltes von anfänglich 0,222 mg/ml (Durchschnittswert) bei einer Minute auf 0,227 mg/ml (Durchschnittswert) bei fünf Minuten der Plasmabehandlungszeit kommt. Während einer längeren Behandlungsdauer können mehr OH-Radikale produziert werden, wodurch auch mehr Wasserstoffperoxid gebildet wird. Zudem gehört Wasserstoffperoxid zu den langlebigen Spezies⁷. Die Regressionskurve zeigt einen linearen Anstieg um den Faktor 0,0011, wenn die Behandlungsdauer eine, zwei und fünf Minuten beträgt. Durch eine relativ geringe Streuung von 53,83 Prozent lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Behandlungsdauer durch ein nichtthermisches Plasma und dem Wasserstoffperoxidgehalt in destilliertem Wasser beobachten.

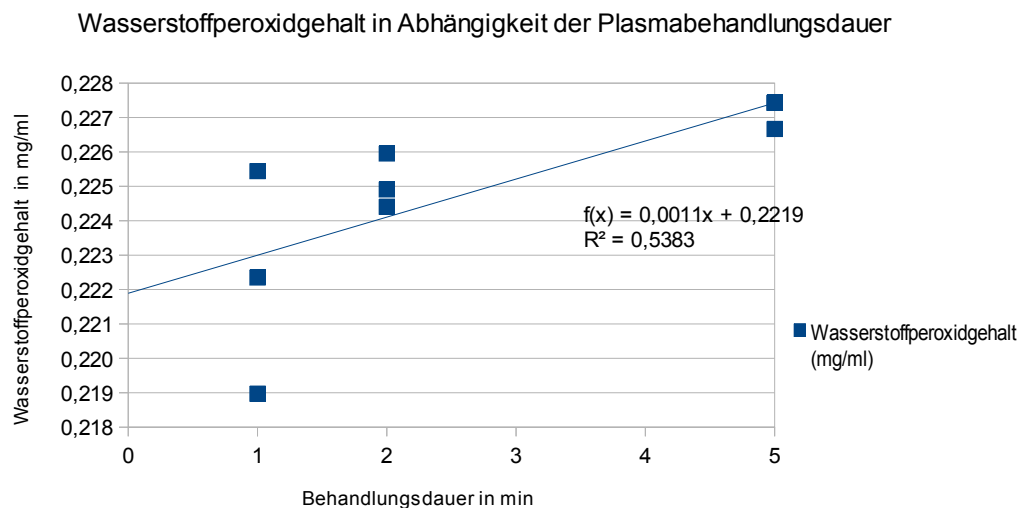


Abb. 5 Versuchsergebnisse: Wasserstoffperoxidgehalt in Abhängigkeit der Behandlungsdauer

⁹ Rajesh Dorai und Mark J Kushner, „A Model for Plasma Modification of Polypropylene Using Atmospheric Pressure Discharges,” Journal of Physics D: Applied Physics 36, no. 6 (2003)

¹⁰ R.J. Meyer, Sauerstoff (Springer Berlin Heidelberg, 1968, S.2606)

Absenken des pH-Wertes

pH-Wert des behandelten A. dest. in Abhängigkeit der Plasmabehandlungsdauer

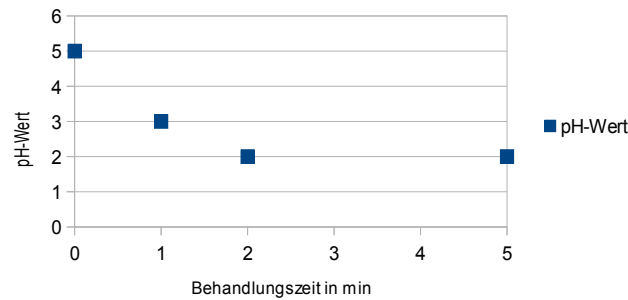


Abb. 6 Versuchsergebnisse: Absenken des pH-Wertes von A. dest. während der Plasmabehandlung

Das Absenken des pH-Wertes von destilliertem Wasser nach einer Plasmabehandlung von ursprünglich pH 5 auf pH 2 wird neben weiteren Reaktionen der RNOS⁹ durch Wasserstoffperoxid und der Eigenschaft als schwache Säure⁸ hervorgerufen. Im Wasser agiert Wasserstoffperoxid als Protonendonator, wobei Hydroniumionen gebildet werden: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{H}_3\text{O}^+$.

4.4. Fehlerdiskussion

Die Kalibrierkurve weist eine hohe Gesamtstreuung ($R^2=0,1154$) auf. Somit können lediglich 11,54 Prozent der Streuung um den Mittelwert von Y mit Hilfe der Regressionsgeraden erklärt werden. Besonders die fünfte Probe mit 5 mg/ml weist eine hohe optische Dichte auf und lässt auf einen Fehler bei der Probenvorbereitung schließen. Diese fehlende Präzision wird beim Verwenden der Ausgleichsgeraden $f(x)$ in dem folgenden Versuch übertragen.

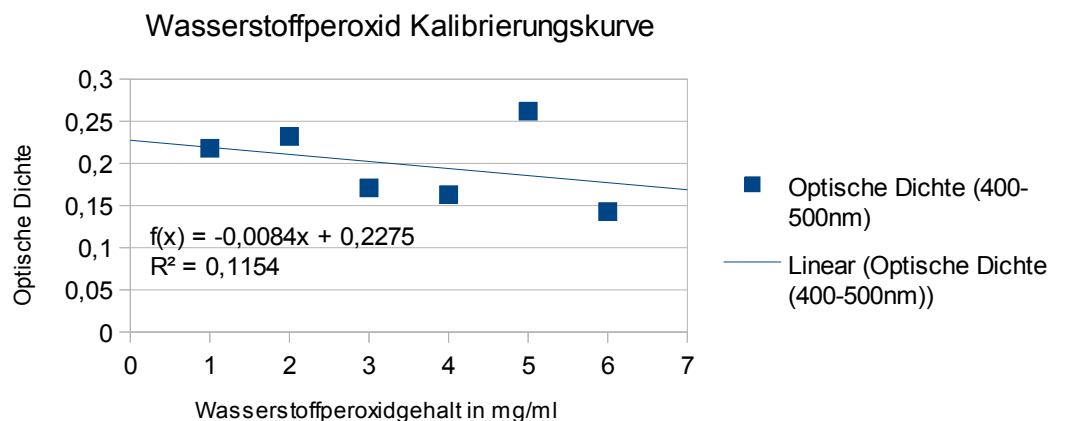


Abb. 7 Versuchsvorbereitung: Kalibrierungskurve von Wasserstoffperoxid

Statistische Fehler:

	Probe 1 (1 min)	Probe 2 (2 min)	Probe 5 (5 min)
Varianz	6,97704E-06	4,14203E-07	1,29718E-07
Standardabweichung	0,002641408	0,000643586	0,000360163
Mittelwert	0,2222556	0,225092	0,22717772
Standardfehler Mittelwert	0,001525018	0,000371575	0,00020794

Die Probe 1 (Gesamtheit der Proben, mit der Behandlungsdauer von einer Minute) weist die höchste Varianz auf, wodurch sich im Diagramm (s. Abb.5) starke Abweichungen zeigen. Lediglich ein Wert liegt nahe der Regressionskurve. Bei dem niedrigsten Wasserstoffperoxidgehalt (0,21897400 mg/ml) (s. Tab.1, Anhang S.18) der ersten Probe lässt sich eine optische Dichte von 1,015 im Bereich von 400-500 nm feststellen, da dies nur einmal auftritt und die optische Dichte über eins liegt, weißt das auf eine falsche Vorbereitung der Probe hin. Dieser systemische Fehler lässt sich auch bei dem höchsten Wasserstoffperoxidgehalt (0,22544200 mg/ml) der Probe 1 vermuten. Bei den Proben der Behandlungsdauer von zwei Minuten (Probe 2) zeigt sich eine deutlich geringe Varianz. Somit ist auch der Standardfehler des Mittelwertes geringer. Bei der letzten Probe zur Behandlungsdauer von fünf Minuten (Probe 5) ist die Varianz am geringsten. Die Annahme von systemischen Fehlern wird dadurch bestätigt, dass es in den folgenden Proben nicht mehr zu solch starken Abweichungen kommt. Somit wurde die Präzision beim Arbeiten verbessert:

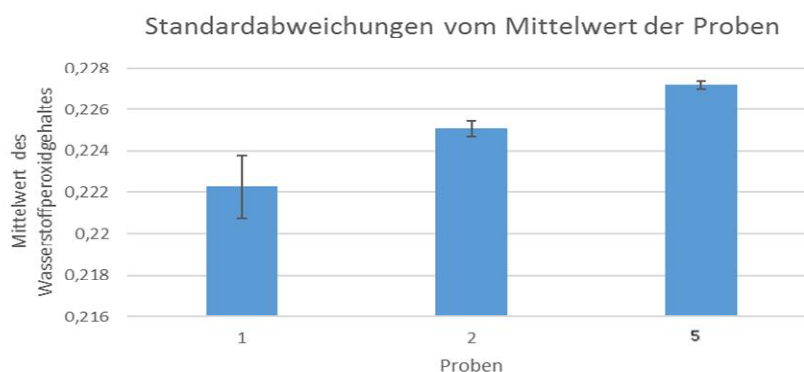


Abb. 8 Fehlerdiskussion: Standardabweichung vom Mittelwert der Proben 1, 2 und 5

Aus den berechneten Standardabweichungen und der dreimaligen Wiederholung des Versuchs für jede Probe ergeben sich folgende Angaben für den Wasserstoffperoxidgehalt:

- Probe 1: Wasserstoffperoxidgehalt: (0,2223 ± 0,0015) mg/ml
- Probe 2: Wasserstoffperoxidgehalt: (0,2250 ± 0,0003) mg/ml
- Probe 3: Wasserstoffperoxidgehalt: (0,2272 ± 0,0002) mg/ml

Insgesamt weist das Diagramm (s. Abb. 5) eine Gesamtstreuung von $R^2 = 0,5383$ auf. Das heißt, dass sich 53,83 Prozent der Streuung um den Mittelwert von Y mit Hilfe der Regressionsgerade erklären lassen. Daher lässt sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Behandlungszeit durch ein nichtthermisches Plasma und dem Wasserstoffperoxidgehalt in destilliertem Wasser herstellen.

5. Inaktivierung von Bakterien durch Wasserstoffperoxid

5.1. Oxidativer Stress

Es ist bekannt, dass Wasserstoffperoxid (H_2O_2) eine antimikrobielle und zytotoxische Wirkung auf behüllte und unbehüllte Viren sowie auf Bakterien hat. Als starkes Oxidationsmittel interagiert es mit Biomolekülen (Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren...) und schädigt diese durch eine Oxidation¹¹. Dadurch wird zunächst die Zellwand der Bakterien beschädigt. Im weiteren Verlauf kann das H_2O_2 als weniger reaktives Spezies verhältnismäßig leicht die Zellmembran passieren¹².

Fenton-Reaktion: H_2O_2 als „OH carrier“¹³

Bei der Fenton-Reaktion findet in der Zelle eine Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Hydroxyl-Radikale und Hydroxidionen durch Eisen(II) statt. Daher kann H_2O_2 als ein „OH carrier“ bezeichnet werden: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ ¹⁴

Dadurch kommt es zu einem Anstieg der ROS-Konzentration ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2) in der Bakterienzelle, wobei das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der ROS in der Zelle gestört ist, das als oxidativer Stress (OS) bezeichnet wird¹⁵. Der oxidative Stress führt zu einer Lipidperoxidation, wobei Lipide durch eine Elektronenabgabe an die freien Radikale (ROS) degradiert werden. Dabei wird zum einen die Lipidschicht der Zellmembran geschädigt und die Membranpermeabilität gesteigert. Zum anderen werden weitere Lipide und (Membran-)Proteine geschädigt¹².

¹¹ Julia Giermann, „Untersuchung der oxidativen Eigenschaften niedermolekularer Percarbonsäuren an Polymeren in wässriger Phase“, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Düsseldorf, Deutschland: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2017

¹² Alexander A. Fridman, Gary Fridman, Plasma Medicine (Chichester: Wiley, 2013, S. 270-277)

¹³ Alexander A. Fridman and Gary Fridman, Plasma Medicine (Chichester: Wiley, 2013, S. 311)

¹⁴ „Fenton-Reaktion“, Lexikon der Biochemie, abgerufen am 11. März 2020, <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/fenton-reaktion/2140>

¹⁵ Sies, H., Oxidativer Stress: Oxidationsmittel und Antioxidationsmittel. Experimental Physiology, 82 doi: 10.1113 / expphysiol.1997.sp004024, 1997

Des Weiteren kommt es zu Mutationen und Schädigungen wie Doppelstrangbrüchen in der DNA⁷. Diese degradierenden Schädigungen der Zellstruktur können zu einem programmierten Zelltod (programmed cell death, PCD) des Bakteriums führen, um das Überleben der Kolonie zu sichern.

PCD durch oxidativen Stress:

Unter normalen Umständen werden ROS durch Enzyme (Katalasen) neutralisiert und der Schaden repariert. Wenn jedoch die ROS-Konzentration in den Zellen zu hoch wird, versagen die Abwehrmechanismen, das zum Zelltod durch oxidativen Stress führt. Unter Stresseinfluss (oxidativer Stress, Strahlenexposition, Nährstoffmangel, Phageninfektionen) wird bei prokaryotischen Zellen eine „Apoptose-ähnliche“ Reaktion vermutet. Der programmierte Zelltod von Bakterien wird in den meisten Fällen durch das Toxin-Antitoxin (TA)-Modul gesteuert¹⁶:

Unter normalen Wachstumsbedingungen hemmt das Antitoxin die Aktivitäten des Toxin-Proteins, indem es direkt an das Toxin bindet oder die Translation hemmt. Unter Stressbedingungen werden die instabilen Antitoxine, die ständig synthetisiert werden müssen, proteolytisch abgebaut, wodurch Toxine freigesetzt werden und essentielle zelluläre Prozesse wie DNA-Replikation und Proteintranslation inhibiert werden. Diese Hemmung hat eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung.

Bei der bakteriellen PCD gibt es zwei bekannte Wege. Der mazEF-Signalweg beruht auf verschiedenen Stresstypen und wirkt auf Bakterienpopulationsebene. Der ALD-Signalweg wird nur durch DNA-Schäden hervorgerufen wird (Abb.9, Anhang S.19). Beide Signalwege können bei oxidativen Stress beobachtet werden.

Unter Stresseinfluss wird bei dem mazEF-Signalweg auf zellulärer Ebene ein extrazellulärer Todesfaktor (EDF) ausgeschüttet. Dabei wird das instabile Antitoxin (MazE) durch die stressinduzierte ClpAP-Protease abgebaut und das stabile Toxin (MazF) führt zum Zelltod. Zudem bildet die Protease weitere EDF-Peptide, das eine weitere Bildung des Toxin-Antitoxin-Komplexes (MazEF-Komplex), also eine Inhibition des Toxins verhindert (Abb. 10, Anhang S.19).

¹⁶ N Allocati et al., „Die for the Community: an Overview of Programmed Cell Death in Bacteria,” *Cell Death & Disease* 6, no. 1 (2015), <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.570>

5.2. pH-Homöostase bei niedrigem pH-Wert

Bakterien sind in einem sauren Milieu einer hohen H_3O^+ -Konzentration ausgesetzt. Bei Stressreaktionen wird versucht zu verhindern, dass Protonen in die Zelle eindringen. Das Eindringen von Protonen in die Zelle wird durch eine veränderte Zellmembran verhindert (s. Abb.11, Anhang S.20). Es wurde beobachtet, dass es bei einem externen Absenken des pH-Wertes mehr gesättigte Fettsäuren in der Membran gebildet werden, wodurch die Membranfluidität steigt. Zudem zeigt sich in einem sauren Milieu eine verringerte Proteinstabilität, die jedoch durch die verstärkte Expression von Genen (E.coli: *dnak* und *groELIES*), die für Chaperonen codieren kompensiert wird.

Das wichtigste Homöostase-System bei der Reaktion auf niedrige pH-Werte ist das Aminosäure-Decarboxylase-Systeme (AS-DC). Dabei wird ein Aminosäure-Molekül unter Verbrauch eines Protons decarboxyliert und bei einem Antiport durch ein Membranprotein aus der Zelle transportiert¹⁷.

Trotz dieser Schutzmechanismen von Bakterien auf niedrige (und hohe) pH-Werte entspricht ein saures Milieu wie der natürliche Säureschutzmantel der Haut nicht dem pH-Optimum der meistens pathogenen Bakterien in Wunden (s. Abb. 12, Anhang S.20). Ein Absenken des pH-Wertes bei einer Plasmabehandlung wurde durch den Versuch bestätigt. Somit kann dies einen wachstumshemmenden Effekt auf Bakterien haben und die Wundheilung fördern.

5.3. Anwendungsmöglichkeit: Behandlung von chronischen Wunden

Die biomedizinische Nutzung von physikalischen Plasmen ist ein neuartiges interdisziplinäres Forschungsgebiet. Neben der Oberflächenmodifikation von Medizinprodukten sind die biologische Dekontamination und die therapeutische Nutzung mögliche Anwendungsgebiete. Die große Bedeutung von nichtthermischen Plasmen als Desinfektions- und Sterilisationsmittel besteht darin, dass zum einen keine Anwendung hoher Temperaturen, radioaktiver Strahlung oder hochreaktiver und meist toxischer Chemikalien nötig ist. Zum anderen sind bisher keine Resistenzbildungen von Mikroorganismen und Viren gegen die Wirkung von Plasma bekannt². Diese desinfizierende Wirkung kann einen wundheilungsfördernden Effekt bei chronischen Wunden haben.

¹⁷ Astrid J. Nettekoven „Untersuchungen zum Einfluss von pH- und CO_2 -Stress auf Physiologie und Threoninproduktion von *Escherichia coli*“, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Köln, Deutschland: Universität zu Köln, 2008, S.11-14

Chronische Wunden sind Wunden, die nach acht Wochen, trotz fachgerechter Therapie nicht abheilen¹⁸. Meistens ist der Wundheilungsprozess durch innere Einflüsse wie Grunderkrankungen (Durchblutungsstörungen, Herzschwäche, Diabetes mellitus, Immunschwäche, Infektionen) beeinträchtigt. Solche Wunden sind meistens kritisch mit Keimen infiziert. „Da die Patienten mit den Wunden im Alltag leben und diese je nach Schweregrad der Erkrankung auch selber versorgen müssen, besiedeln Bakterien früher oder später praktisch alle chronischen Wunden“ (Prof. Dr. Joachim Dissemmond)¹⁹. Nach einer Studie der Klinik für Dermatologie am UK Essen und dem Institut für Mikrobiologie im Jahr 2014 zeigte sich, dass bei neun Prozent der 100 untersuchten Patienten neben gramnegativen Bakterien auch Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) nachgewiesen werden konnte²⁰. Dabei stellt sich die Behandlung als besondere Herausforderung heraus. Eine Behandlung mit einem nichtthermischen Plasma kann aufgrund der beschriebenen biologischen Effekte den Wundheilungsprozess fördern, wobei dies nicht auf nicht-resistente Bakterien beschränkt ist².

Ein weiteres Problem bei chronischen Wunden ist der dauerhaft hohe pH-Wert der Wunde ($\text{pH} > 7$) (s. Abb. 13, Anhang S.21). Das Wachstum vieler humanpathogener Keime wird bei einem pH-Wert Bereich $< 6,0$ und besonders zwischen $4,0$ und $5,0$ gehemmt. Das pH-Optimum der Keime liegt zwischen $6,2$ bis $7,8$ ²⁰.

Dahingegen fördern alkalische pH-Werte der Haut, wie es in chronischen Wunden der Fall ist, eine Kolonisation mit Bakterien²¹. Bei dem Experiment wurde ein eindeutiges Absinken des pH-Wertes festgestellt, sodass eine Behandlung von chronischen Wunden mit nichtthermischen Plasma den Wundheilungsprozess durch das Absenken des pH-Wertes fördern kann.

¹⁸ Joachim Dissemmond et al. Definition für die Wundbehandlung. Ausgabe 3/2016, S.256f.

¹⁹ "Untersuchung von Bakterien in Chronischen Wunden: Deutscher Wundpreis Geht 2014 Erstmals nach Essen: Uniklinik Essen", Universitätsklinikum Essen, abgerufen am 11. März 2020, https://www.uk-essen.de/aktuelles/presse/pressemitteilungen-2014/pressemitteilungen-2014-detail/?L%5B0%5D=986&tx_ttnews%5Bpointer%5D=27&cHash=8f6504e8aef5f828cd4c0741e114aca2

²⁰ Joachim Dissemmond, et al. pH-Wert des Milieus chronischer Wunden. *Der Hautarzt* 10/2003. S.964

²¹ Joachim Dissemmond, HARTMANN Wundforum, Ausgabe 1/2006, S. 16

6. Fazit

Durch meinen Versuch wurde gezeigt, dass Wasserstoffperoxid bei einer Plasmaentladung von destilliertem Wasser mit Luft als Prozessgas entsteht. Dabei wurde der pH-Wert des Wassers stark gesenkt. Die schwache Säure Wasserstoffperoxid agiert als Protonendonator, wodurch im Wasser Hydroniumionen gebildet werden. Des Weiteren konnte eine Abhängigkeit zwischen der Behandlungsdauer mit nichtthermischem Plasma und dem Wasserstoffperoxidgehalt festgestellt werden, die nahezu linear ist. Durch meine Literaturrecherche konnte gezeigt werden, dass Wasserstoffperoxid neben Zellwand und Membranschäden, eine oxidative Stressreaktion in Bakterien hervorruft und bei der Fenton-Reaktion zu Hydroxyl-Radikalen abgebaut wird. Der Anstieg der ROS-Konzentration kann zu einem programmierten Zelltod durch oxidativen Stress führen. Dieser Vorgang wird dabei zumeist durch das TA-Modul gesteuert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es zu einem Absinken des pH-Wertes von destilliertem Wasser nach einer Plasmabehandlung kommt, der nach einer kurzen Behandlungsdauer bereits stark fällt und bei längeren Behandlungsdauern konstant niedrig bleibt. Je nach pH-Optimum des Bakteriums werden dabei verschiedene Mechanismen der pH-Homöostase genutzt, um sich einem sauren Milieu anzupassen.

7. Ausblick

Das Ergebnis könnte zukünftig durch eine praktische Untersuchung der Inaktivierung von Bakterien ergänzt werden. Dazu könnten verschiedene Parameter wie die Behandlungszeit oder die Temperatur des Mediums verändert werden, um eventuell optimale Behandlungsbedingungen für eine desinfizierende Wirkung eines nichtthermischen Plasmas zu entwickeln. Des Weiteren wäre eine Untersuchung, bei der zwischen gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie Arten mit unterschiedlichen pH-Optima differenziert wird, aufschlussreich für eine Behandlung auf der Haut und als Therapie für chronische Wunden.

Literaturverzeichnis

Bücher

- [1] Metelmann, Hans-Robert, Von Woedtke, Thomas, Weltmann, Klaus-Dieter. Plas-mamedizin: Kaltplasma in der Medizinischen Anwendung. Berlin: Springer Berlin, 2016. S.19
- [2] Metelmann, Hans-Robert, Von Woedtke, Thomas, Weltmann, Klaus-Dieter. Plas-mamedizin: Kaltplasma in der Medizinischen Anwendung. Berlin: Springer Berlin, 2016. S. 57f.
- [5] Fridman, Alexander A. Plasma Chemistry. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. S.1-5
- [6] Fridman, Alexander A. Plasma Chemistry. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. S. 239
- [10] Meyer, R.J., Sauerstoff. Berlin: Springer Heidelberg, 1968, S.2606
- [12] Fridman, Alexander A. Fridman, Gary. Plasma Medicine, Chichister: Wiley, 2013, .S. 270-277
- [13] Fridman, Alexander A. Fridman, Gary. Plasma Medicine, Chichister: Wiley, 2013, .S. 311

Zeitschriften

- [18] Dissemond, J., Bültemann, A., Gerber, V. et al. Definitionen für die Wundbehand-lung. Hautarzt Ausgabe 3/2016 67, S. 256f.
- [20] Dissemond J., Witthoff M., Brauns T. C. et al. pH-Wert des Milieus chronischer Wunden. Der Hautarzt 10/2003. S.964
- [21] Dissemond J., HARTMANN Wundforum, Ausgabe 1/2006, S. 16

Abschlussarbeiten

- [11] Giermann, Julia, „Untersuchung der oxidativen Eigenschaften niedermolekularer Percarbonsäuren an Polymeren in wässriger Phase“, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Deutschland, Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2017
- [17] Nettekoven Astrid J., „Untersuchungen zum Einfluss von pH- und CO₂-Stress auf Physiologie und Threoninproduktion von Escherichia coli“, Dissertation, Mathema-tisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Köln, Deutschland: Universität zu Köln, 2008, S.11-14

Zeitschriften (online)

- [7] Sakiyama, Yukinori, David B Graves, Hung-Wen Chang, Tetsuji Shimizu, and Gre-gor E Morfill. „Plasma Chemistry Model of Surface Microdischarge in Humid Air and

Dynamics of Reactive Neutral Species.” *Journal of Physics D: Applied Physics* 45, no. 42 (Januar 2012): 425201. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/42/425201>.

[8] Liu, Jiandi, Bangbang He, Qiang Chen, Junshuai Li, Qing Xiong, Guanghui Yue, Xianhui Zhang, Size Yang, Hai Liu, and Qing Huo Liu. „Direct Synthesis of Hydrogen Peroxide from Plasma-Water Interactions.” *Scientific Reports* 6, no. 1 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep38454>.

[9] Dorai, Rajesh, Mark J Kushner. „A Model for Plasma Modification of Polypropylene Using Atmospheric Pressure Discharges.” *Journal of Physics D: Applied Physics* 36, no. 6 (2003): 666–85. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/6/309>.

[15] Sies, H., *Oxidativer Stress: Oxidationsmittel und Antioxidationsmittel. Experimental Physiology*, 82 doi: 10.1113 / expphysiol.1997.sp004024, 1997

[16] Allocati, N, M Masulli, C Di Ilio, V De Laurenzi. „Die for the Community: an Overview of Programmed Cell Death in Bacteria.” *Cell Death & Disease* 6, no. 1 (2015). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.570>

Internetquellen

[3] Infektionskrankheiten. Bundesgesundheitsministerium. Zugriff 8. März 2020. <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/infektionskrankheiten.html>.

[4] "Fragen und Antworten zu Personen-Resistenzen." Bundesgesundheitsministerium. Zugriff am 7. März 2020. <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/fragen-und-antworten.html>.

[14]“Fenton-Reaktion,” *Lexikon der Biochemie*, abgerufen am 11. März 2020, <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/fenton-reaktion/2140>

[19]"Untersuchung von Bakterien in Chronischen Wunden: Deutscher Wundpreis Geht 2014 Erstmals nach Essen: Uniklinik Essen", Universitätsklinikum Essen, abgerufen am 11. März 2020, <https://www.uk-essen.de/aktuelles/presse/pressemitteilungen-2014/pressemitteilungen-2014->

de-

tail/?L%5B0%5D=986&tx_ttnews%5Bpointer%5D=27&cHash=8f6504e8aef5f828cd4c0741e114aca2

Anhang

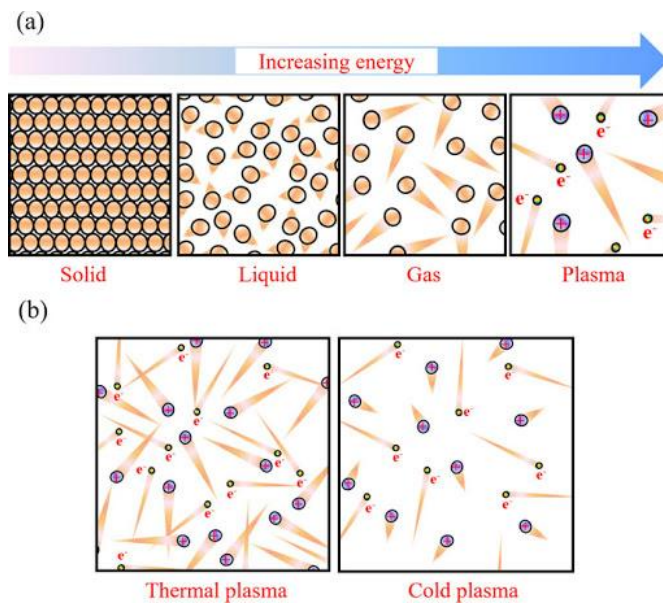


Abb. 1 a) Schematische Darstellung der Aggregatzustände **1b)** Unterschied zwischen thermischen und nicht thermischen Plasmen

(Bildquelle: Yan, Dayun, Jonathan H Sherman, and Michael Keidar. „Cold Atmospheric Plasma, a Novel Promising Anti-Cancer Treatment Modality.” *Oncotarget. Impact Journals LLC*, 28 Februar 2017. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5362540/.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5362540/))

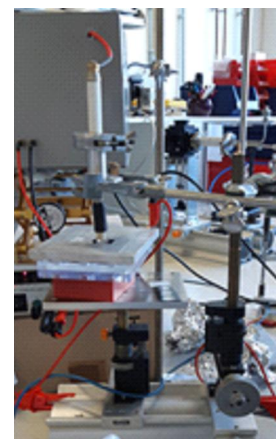
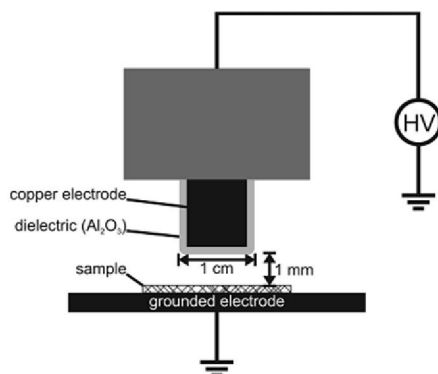


Abb. 2 Schematischer Aufbau der verwendeten DBD

Abb. 3 Versuchsaufbau (eigenes Foto)

(Bildquelle: Dorai, Rajesh, and Mark J Kushner. „A Model for Plasma Modification of Polypropylene Using Atmospheric Pressure Discharges.” *Journal of Physics D: Applied Physics* 36, no. 6 (2003): 666–85. [https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/6/309.](https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/6/309))

Wasserstoffperoxidgehalt (mg/ml)	Optische Dichte (400-500nm)
1	0,218
2	0,232
3	0,171
4	0,163
5	0,262
6	0,143

Behandlungsdauer	Optische Dichte (400-500nm)
1	0,245
1	0,613
1	1,015
2	0,184
2	0,368
2	0,308
5	0,0075
5	0,0086
5	0,099

Wasserstoffperoxidgehalt (mg/ml) mit $f(x) = -0,0084x + 0,2275$	Optische Dichte
0,22544200	0,245
0,22235080	0,613
0,21897400	1,015
0,22595440	0,184
0,22440880	0,368
0,22491280	0,308
0,22743700	0,0075
0,22742776	0,0086
0,22666840	0,099

Behandlungsdauer	Wasserstoffperoxidgehalt (mg/ml)
1	0,22544200
1	0,22235080
1	0,21897400
2	0,22595440
2	0,22440880
2	0,2249128
5	0,22743700
5	0,22742776
5	0,22666840

Tab. 1 Optische Dichte-Angaben zu dem Versuch und Berechnung des Wasserstoffperoxidgehaltes

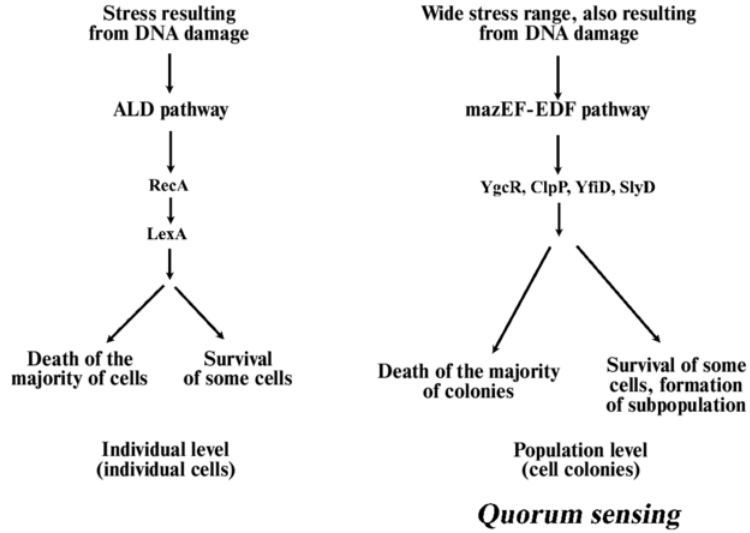


Abb. 9 Bakterielle PCD durch ALD- und mazEF-EDF-Signalweg
 (Bildquelle: Koksharova, O. A. „Bacteria and Phenoptosis.” *Biochemistry (Moscow)* 78, no. 9 (2013): 963–70. <https://doi.org/10.1134/s0006297913090010>)

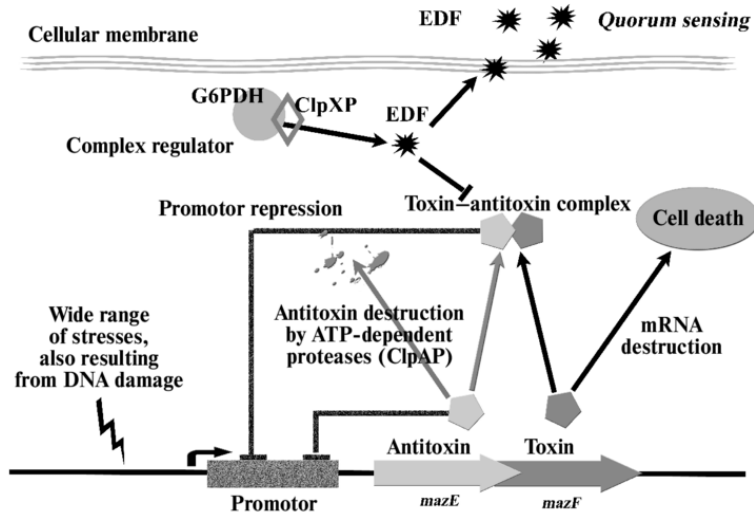


Abb. 10 mazEF-EDF-Signalweg auf zellulärer Ebene bei *E.coli*.
 (Bildquelle: Koksharova, O. A. „Bacteria and Phenoptosis.” *Biochemistry (Moscow)* 78, no. 9 (2013): 963–70. <https://doi.org/10.1134/s0006297913090010>)

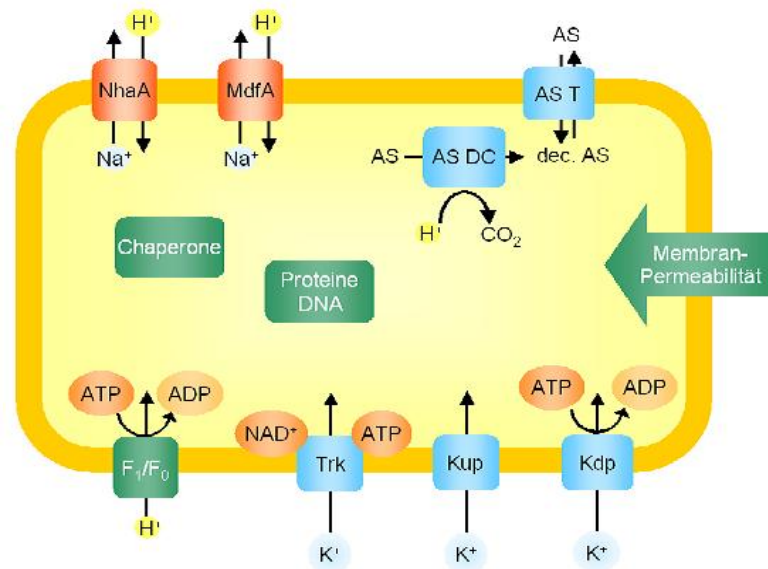


Abb. 11 Bekannte Komponenten der pH-Homöostase in *E. coli*. Proteine, die an der Antwort auf niedrige externe pH-Werte beteiligt sind, sind blau dargestellt, Komponenten der pH-Homöostase bei hohen pH-Werten sind rot gezeichnet. Grüne Systeme sind in beiden Fällen beteiligt
(Bildquelle: Astrid J. Nettekoven „Untersuchungen zum Einfluss von pH- und CO_2 -Stress auf Physiologie und Threoninproduktion von *Escherichia coli*“, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Köln, Deutschland: Universität zu Köln, 2008, S.11-14)

<i>Wound-associated microorganisms</i>	<i>Optimum pH for growth</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.0–7.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	7.0–9.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.6–7.0
<i>Coagulase-negative staphylococci</i>	7.0–7.5
<i>Anaerobic bacteria</i>	6.0–7.0
<i>Escherichia coli</i>	6.0–7.0
<i>Klebsiella spp.</i>	5.5–7.0
<i>Candida spp.</i>	7.0–8.0

Abb. 12 pH-Optima der Wund-assoziierten Mikroorganismen in chronischen Wunden

(Quelle: Jones, Eleri M., Christine A. Cochrane, and Steven L. Percival. „The Effect of PH on the Extracellular Matrix and Biofilms.” *Advances in Wound Care* 4, no. 7 (2015): 431–39. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0538>.)

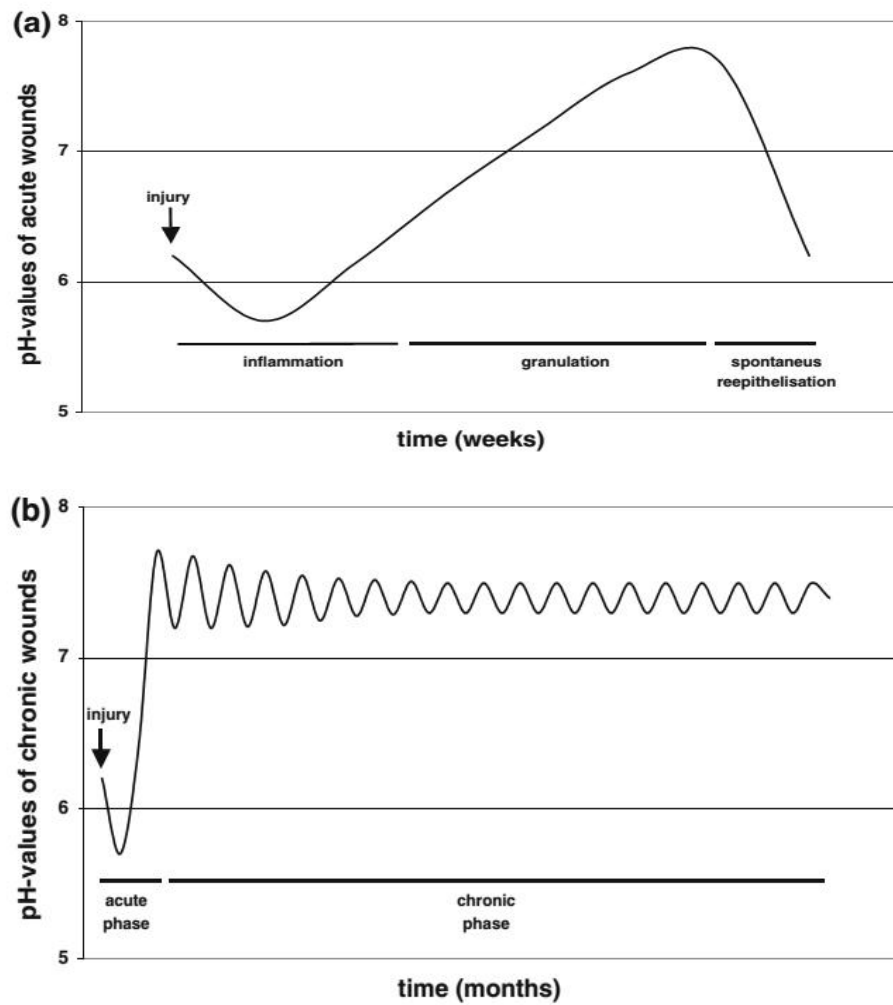


Abb. 13 pH-Wert bei akuten Wunden (13a) und chronischen Wunden (13b) im Zeitverlauf
 (Bildquelle: Schneider, Lars Alexander, Andreas Korber, Stephan Grabbe, and Joachim Dissemond. „Influence of PH on Wound-Healing: a New Perspective for Wound-Therapy?“ *Archives of Dermatological Research* 298, no. 9 (August 2006): 413–20. <https://doi.org/10.1007/s00403-006-0713-x>)

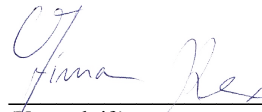
Schlussklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

Bochum, 12.03.2020

(Ort; Datum)



Finna Rex

(Unterschrift)