



**Entwicklung einer Apparatur zur antimikrobiellen Behandlung von
Wellplatten mittels Atmosphärendruckplasma**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)
der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik
der Universität Rostock

vorgelegt von
Marcel Hähnel, geb. am 11. April 1981 in Wolgast
aus Greifswald

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0080-5

Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. habil. Kerstin Thurow,
Institut für Automatisierungstechnik Universität Rostock

Prof. Dr.rer.nat. Holger Kersten,
Institut für Experimentelle und Angewandte Physik Universität Kiel

Prof. Dr.rer.nat. Kurt Becker,
Polytechnic Institute of New York University

Datum der Verteidigung: 23.02.2011

Einleitung

Immer mehr Antibiotika verlieren ihre Wirkung, da besonders die Zahl der resistenten Krankenhauskeime stetig steigt. Auch zwingt das Auslaufen der Schutzrechte bestimmter Pharmazeutika die Hersteller, zu einer immer intensiveren Suche nach neuen möglichen Blockbustern. Die wachsende Anzahl an Proben und die gleichzeitig steigenden Anforderungen an die Testverfahren erfordern ein hohes Maß an Automatisierung. Hierzu werden High Throughput und High Content Screening Methoden eingesetzt [1]. Robotergestützte Screeningsysteme, die mehrere Quadratmeter Stellfläche benötigen, müssen aus Gründen der Sterilität in Reinräumen installiert werden. Installation und laufende Kosten von Reinräumen bilden einen erheblichen Kostenfaktor. Das Personal ist in solchen Reinräumen besonderen psychischen und physischen Belastungen ausgesetzt.

Der Mensch ist eine der größten Quellen für Luftverunreinigungen in Form von mikroskopischen Partikeln [2]. Die Emissionsrate beträgt zwischen 10^6 und 10^7 Partikel pro Minute. Zusammen mit Partikeln werden auch Mikroorganismen emittiert, die im Wesentlichen an den Partikeln angelagert sind. Geht man von einem Verhältnis von Mikroorganismen zu Partikeln von 1:1000 bis 1:5000 aus, so werden vom Menschen pro Minute bis zu 10000 Mikroorganismen freigesetzt. Steril verpackte Arbeitsmaterialien wie zum Beispiel Petrischalen oder Zellkulturplatten, welche in einem Diagnostik- oder Forschungslabor außerhalb aseptischer Bedingungen geöffnet werden, können durch über die Luft übertragene Mikroorganismen kontaminiert werden. Um vor der Verwendung der Materialien eine für den Anwendungsbereich relevante Keimzahl oder Sterilität zu erreichen, sind zusätzliche keimreduzierende Maßnahmen notwendig. Für automatisierte Screeningverfahren kommen 96er, 384er oder 1536er Mikrotiterplatten zum Einsatz. Aus Kostengründen werden diese als Einwegartikel aus thermolabilen Kunststoff-

II

fen wie zum Beispiel Polystyrol hergestellt. Sterilisiert werden können diese nur durch sehr aufwändige und hohe Anforderungen an die Sicherheit stellende Verfahren, zum Beispiel auf Basis von Gammastrahlung. Plasmen stellen eine neue Möglichkeit zur Sterilisation dar und sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden, zum Beispiel [3–5].

Seit Siemens 1857 mit einer besonderen elektrischen Anordnung, welche aus zwei koaxialen Glasröhren (siehe Abbildung 1), die ihrerseits die Elektroden trennten, die Erzeugung von Ozon demonstrierte [6], werden dielektrisch behinderte Entladungen für eine Vielzahl von Prozessen eingesetzt [7–10].

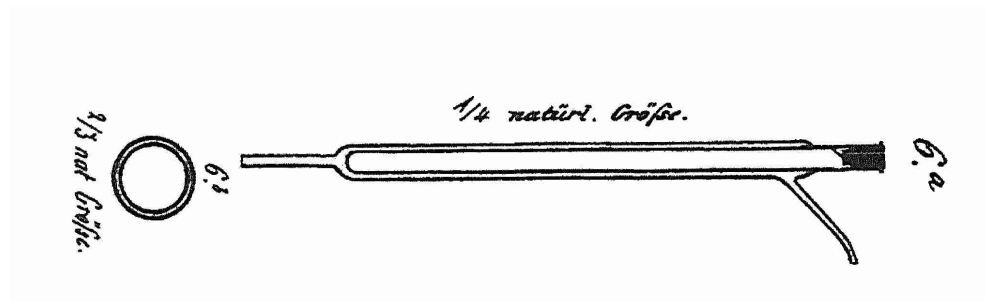


Abbildung 1: Anordnung von W. Siemens (1857) zur Erzeugung von Ozon [6]

Die Erzeugung von Ozon, mittels nicht-thermischen Atmosphärendruckplasmen, ist auch heute, fast 150 Jahre nach der Entdeckung durch Siemens, ein bedeutender industrieller Prozess, welcher hinsichtlich der Ausbeute weiter intensiv untersucht wird. Ozon wird beispielsweise zur Aufbereitung von Trinkwasser eingesetzt.

Weitere Einsatzgebiete dieser Plasmen sind die Reinigung von Gasen und Abgasen [11], Excimer Lampen, Plasmabildschirme und Oberflächenbehandlungen [7, 8, 10]. Unter dem Begriff der Oberflächenbehandlungen sind Prozesse wie die Aktivierung von Kunststoffen [9, 12], das Entfernen von Oxid- und Sulfidschichten auf Metallen [9] sowie kohlenwasserstoffhaltigen Schichten auf Oberflächen [13, 14] zu verstehen. Seit einigen Jahren werden auch keimreduzierende Prozesse mit dielektrisch behinderten Entladungen bei Atmosphärendruck durchgeführt.

Physikalische anisotherme Atmosphärendruckplasmen in Luft können neben

Elektronen mit hohen mittleren Energien und Ionen auch hoch reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) erzeugen. Weiterhin können solche Plasmen unter Verwendung bestimmter Gase UV- und VUV-Strahlung aussenden. Die Erzeugung dieser antimikrobiell wirksamen Komponenten erfolgt dabei aus nicht toxischen Gasen, die nach der Behandlung keine chemischen Abfälle hinterlassen. Des Weiteren sind auf Grund der niedrigen Temperatur der schweren Teilchen auch Behandlungen von thermisch sensiblen Kunststoffen wie Polystyrol möglich.

Ziele und Herangehensweise

Aus der wissenschaftlichen Literatur ist bekannt, dass Plasmen bei Atmosphärendruck und in verschiedenen Gasen, eine Behandlung von Kunststoffen ermöglichen. Derzeit gibt es kein Plasmasystem auf dem Markt, mit dem eine antimikrobielle Behandlung von thermolabilen Multiwellplatten bei Atmosphärendruck, direkt vor der Verwendung, möglich ist.

Ziele:

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Konzeptes zur gleichzeitig stattfindenden Keimreduktion aller Wells einer 96er Multiwellplatte mittels eines Atmosphärendruckplasmas in Luft. Als weitere Randbedingungen sind die Keimreduktion um mindestens zwei Log-Stufen, die Zellkompatibilität der behandelten Flächen, die Integrierbarkeit in bestehende automatisierte Analysensysteme und eine Taktzeit von weniger als zwei Minuten zu nennen.

Herangehensweise:

Um die genannten Ziele erreichen zu können, sind folgende wissenschaftliche Untersuchungen und technische Entwicklungen notwendig:

- Zunächst werden, wegen besserer analytischer Zugänglichkeit, grundlegende Untersuchungen an zweidimensionalen Polystyrolsubstraten durchgeführt. Hierzu ist ein System mit einer planaren Elektrodengeometrie aufzubauen. Die relative Luftfeuchtigkeit des Prozessgases, die Hochspannung und das Pulsmuster der Plasmaentladung sind steuerbar.

IV

- Der antimikrobielle Effekt des verwendeten Luftplasma soll in Abhängigkeit von der Prozessgasfeuchte, der Behandlungszeit und der Plasmaleistung bestimmt werden. Behandelt werden Sporen von *Bacillus atrophaeus* auf Polystyrol. Die Sporen liegen während der Behandlung im trockenen Zustand vor.
- Das eingesetzte Plasma wird unter den variierenden Prozessparametern hinsichtlich der in das Plasma eingebrachten Leistung untersucht. Weiterhin wird die vom Plasma emittierte Strahlung im UV Bereich bestimmt, um Aussagen über mögliche wirksame Plasmaspezies treffen zu können.
- Native Polystyroloberflächen werden unter relevanten Prozessparametern behandelt und mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie und Kontaktwinkelmessungen auf ihre chemischen Eigenschaften untersucht.
- Um Ergebnisse zu den antimikrobiell wirksamen Plasmaspezies zu erhalten, werden die gleichen Sporen vor und nach der Plasmabehandlung mittels eines Rasterkraftmikroskops vermessen. Hieraus lassen sich morphologische Veränderungen erkennen.
- Die in den Voruntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sollen in die Entwicklung und den Aufbau eines Plasmasystems zur antimikrobiellen Behandlung von 96er Multiwellplatten einfließen.
 - Es hat eine Verifizierung der antimikrobiellen Ergebnisse zu erfolgen. Die Behandlungszeiten müssen entsprechend der Abtötungsrate und des geforderten Reduktionsfaktors angepasst werden.
 - Weiterhin sind die Zellkultureigenschaften der mit Plasma behandelten Multiwellplatten zu bestimmen. Hierzu sollen verschiedene Zelllinien und verschiedene Zellkulturplatten verwendet werden.
 - Für die spätere Auslegung des Plasmasystems ist die Bestimmung der elektrischen Parameter, der neu entwickelten Anordnung, notwendig.
 - Ein Prozessablauf und die zur Integration notwendigen Schnittstellen und Anforderungen sind zu definieren.

Aufbau der Arbeit

- Kapitel 1: gibt einen Überblick über die klassischen und plasmabasierten Verfahren zur Sterilisation. Weiterhin werden die chemischen Eigenschaften von Luftplasmen und deren Wechselwirkung mit Oberflächen sowie die notwendigen diagnostischen Methoden beschrieben. Ferner wird in diesem Kapitel ein allgemeiner Überblick über die zum Verständnis notwendigen Grundlagen gegeben.
- Kapitel 2: diskutiert die Ergebnisse aus zweidimensionalen Voruntersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Luftplasmen mit variablen Luftfeuchtigkeiten sowie deren Eigenschaften und Wechselwirkungen mit Polystyroloberflächen.
- Kapitel 3: beschreibt die konstruktive Umsetzung der im Kapitel 2 gewonnenen Erkenntnisse in zwei verschiedenen Systemen zur Behandlung von 96er Multiwellplatten. Es enthält die Ergebnisse zur antimikrobiellen Wirksamkeit und zu den Plasmeeigenschaften dieser Systeme. Weiterhin werden die nach der Plasmabehandlung resultierenden Zellkultureigenschaften beschrieben.
- Kapitel 4: gibt eine Zusammenfassung der konstruktiven Umsetzungen und deren Eigenschaften, welche aus den wissenschaftlichen Voruntersuchungen abgeleitet wurden. Abschließend enthält dieses Kapitel einen Ausblick über Weiterentwicklungen und Einsatzmöglichkeiten.
- Anhang A-C: enthalten das Abkürzungsverzeichnis, ergänzende Abbildungen und Tabellen zu den vorangegangenen Kapiteln sowie Beschreibungen zum experimentellen Aufbau und Versuchsprotokolle zur Bestimmung der Plasma- und Oberflächeneigenschaften, Keimreduktion und Zellkompatibilität.

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlagen	1
1.1	Etablierte keimreduzierende Verfahren	1
1.2	Stand der Technik - Plasmaverfahren	3
1.2.1	Wirkmechanismen	3
1.2.2	Systeme und Patente	8
1.3	Atmosphärendruckplasmen	10
1.3.1	Dielektrisch behinderte Plasmen	11
1.3.2	Koronaentladung	16
1.4	Plasmachemie von Luftplasmen	19
1.4.1	Gasphase	19
1.4.2	Polymeroberflächen	22
1.5	Plasmadiagnostik	26
1.5.1	Plasmaleistung	27
1.5.2	Optische Emissionsspektroskopie	29
1.6	Oberflächendiagnostik	31
1.6.1	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie	31
1.6.2	Kontaktwinkel	33
1.6.3	Rasterkraftmikroskopie	35
1.7	Biologie der Zelle	36
1.7.1	Bacteria	37
1.7.2	Eukarya	39
2	Ergebnisse und Diskussion	43
2.1	Plasmaparameter	43
2.2	Oberflächeneigenschaften und- veränderungen	46
2.3	Mikrobiologie	57
2.4	Veränderung der Mikroorganismen	60
2.5	Zusammenfassung der Voruntersuchungen	65

3	Konstruktive Umsetzung	67
3.1	Systemaufbau Plasmafinger	68
3.2	Systemaufbau Korona-DBE	72
3.3	Systemkomponenten	74
3.4	Schnittstellen für die Integration	77
3.5	Prozessablaufplan	80
3.6	Elektrische Parameter der Anordnungen	81
3.7	Verifizierung der antimikrobiellen Wirkung	88
3.8	Zellbiologische Untersuchungen	93
4	Zusammenfassung - Summary	101
A	Abkürzungsverzeichnis	109
B	Versuchsaufbau und Analytik	111
B.1	Elektrodensystem	113
B.2	Hochspannungsversorgung	114
B.3	Plasmadiagnostik	115
B.3.1	OES	115
B.3.2	ICCD-Aufnahmen	116
B.3.3	Plasmaleistung	116
B.4	Oberflächendiagnostik	117
B.4.1	Kontaktwinkel	117
B.4.2	FTIR	117
B.4.3	Rasterkraftmikroskopie	117
B.5	Mikrobiologie	119
B.6	Zellbiologie	121
C	Ergänzende Abbildungen und Tabellen	123

Kapitel 1

Grundlagen

1.1 Etablierte keimreduzierende Verfahren

Die Sterilisation ist erst seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt. 1878 veröffentlichte Pasteur einen Bericht über seine Erfahrungen in der Sterilisation von chirurgischen Instrumenten in einem Heißwasserbad. Nur wenige Jahre später widmete sich auch Robert Koch diesem Gebiet. Das Abtöten von Keimen mittels Hitze oder feuchter Hitze waren über lange Zeit die Methoden, mit der Lebensmittel als sowie Operationsbesteck keimfrei gemacht wurden. Heute versteht man unter Sterilisation *das Freimachen eines Gegenstandes von vermehrungsfähigen Organismen* [15].

Die heute bekannten Sterilisationsmethoden lassen sich in chemische und physikalische Verfahren unterteilen [16]. Bei den chemischen Verfahren muss das Sterilisationsmittel direkt in Kontakt mit dem zu sterilisierenden Material kommen. Des weiteren gibt es physikalisch-chemische Verfahren. Bei den physikalisch-chemischen Verfahren müssen, wie bei den chemischen Verfahren, die Moleküle des Sterilisationsmittels in direkten physikalischen Kontakt mit den Mikroorganismen kommen. Gleichzeitig wirken neben den chemischen Faktoren auch rein physikalische Prozesse.

Die Wirksamkeit der Abtötung von Mikroorganismen ist bei allen Sterilisationsverfahren von der Art der vorhandenen Mikroorganismen, deren Funktionszustand, der Ausgangskeimzahl, der Behandlungszeit und von den Umge-

Tabelle 1.1: Übersicht über die Einordnung von Sterilisationsverfahren

physikalische Verfahren

trockene Hitze
 ionisierende Strahlung
 Mikrowellenstrahlung
 Impulsverfahren

chemische Verfahren

mikrobiozide Gase
 organische Lösungsmittel
 Oxidative Systeme

physikalisch-chemische Verfahren

feuchte Hitze
 Mikrowellenstrahlung und Bakterizide
 Niedertemperatur Dampf und Formaldehyd

bungsbedingungen abhängig [2]. Unter Umgebungsbedingungen sind zum Beispiel die Temperatur, der pH-Wert von Lösungen, die umgebende Atmosphäre, Feuchtigkeiten, Begleitstoffe und die Keime eventuell umgebende schützende Schmutzhüllen zu verstehen.

Das physikalische Verfahren hoher Temperaturen, zielt auf die Koagulation und Denaturierung von Eiweißen sowie den Zerfall von Lipidketten ab. Polysaccharide und Kohlenhydrate sind hitzeunempfindlicher als Lipide und Eiweiße. Verwendet man statt trockener, feuchte Hitze als physikalisch-chemisches Verfahren, so lassen sich bessere Inaktivierungen erzielen.

Sterilisation mit UV-Licht bewirkt das Verschmelzen von benachbarten Basen in der DNA zu sinnlosen Dimeren. Unter Verwendung von radioaktiver Strahlung hingegen kommt es zu Strangbrüchen in der DNA und damit zu Informationsverlust und Mutationen. Weiterhin können durch radioaktive Strahlung Molekülketten zerschlagen und Radikale gebildet werden, wodurch weitere molekulare Reaktionen initiiert werden. Verwendet man Mikrowellenstrahlung zur Inaktivierung von Organismen, so ist eine Mindestfeuchtigkeit notwendig, um eine Wirkung durch Wärmeeintrag zu erreichen.

Die Gruppe der chemischen Verfahren ist durch die große Anzahl von einsetzbaren chemischen Substanzen (z.B. Ozon, Wasserstoffperoxid, Kaliumpermanganat, Persäuren, Säuren, Laugen, Aldehyde, Phenole, Ethylenoxid, Alkohole ...) sehr vielfältig. Proteine werden durch Säuren, Laugen, Lösungsmittel und andere De-

tergentien denaturiert, durch Laugen protolysiert und durch Proteasen gespalten. Lipide hingegen können durch Lipasen gespalten oder durch Lösungsmittel aufgelöst werden. Weiterhin können durch Säuren Bindungskomponenten von den Lipiden abgespalten werden. Polysaccharide und Nukleinsäuren werden durch Säuren und Laugen geschädigt und durch Enzyme lysiert. Detaillierte Wirkmechanismen der einzelnen chemischen Verfahren sind in [2] oder [17] verzeichnet. Anders als bei der Sterilisation, wird bei der Desinfektion eine gezielte Abtötung oder irreversible Inaktivierung von krankmachenden Erregern verstanden, wobei die Zahl der Erreger auf einem Gegenstand in jedem Fall unterhalb des Infektionsinokulum reduziert wird [16]. Die Desinfektion ist zum Beispiel bei der Verarbeitung und Herstellung von Lebensmitteln von Bedeutung. Hier ist es ausreichend die Zahl der Erreger unter einen Schwellwert zu reduzieren, da der menschliche Körper durch eigene Abwehrmechanismen, einer Infektion entgegenwirken kann.

1.2 Stand der Technik - Plasmaverfahren

1.2.1 Wirkmechanismen

Plasmen können in Abhängigkeit von der Gaszusammensetzung, Energieeinspeisung und dem Prozessdruck verschiedenste Spezies generieren [18]. Neben geladenen Teilchen und Wärme entstehen auch Radikale und UV-Photonen, die für eine Vielzahl von Prozessen von Bedeutung sind. Unterschieden werden muss, ob die Probe in direkten Kontakt mit dem Plasma kommt oder nur indirekt behandelt wird [19]. Wird die Probe direkt dem Plasma ausgesetzt, so kommen alle Plasmaspezies, inklusive der geladenen Teilchen, mit der Probe in Kontakt. Wird die Probe nur im Remote-Betrieb behandelt, so kommt diese nicht in direkten Kontakt mit dem Plasma. Geladene Teilchen können in diesem Fall die Oberfläche der Probe nicht erreichen. Auch ist der Eintrag an thermischer Energie durch Neutralteilchen deutlich geringer als bei direktem Kontakt [18, 19].

Die in der Literatur beschriebenen Reduktionskinetiken von Mikroorganismen sind ein Ergebnis aus der Vielzahl von verwendeten Plasmaquellen und Mikroorganismen. Im Folgenden werden vorrangig solche Arbeiten betrachtet, die mit Sporen von *Bacillus atropheus* oder denen des *Geobacillus stearothermophilus*

durchgeführt wurden, da diese als besonders widerstandsfähig gelten.

In der Literatur wird unter Verwendung von Niederdruckplasmen von Reduktionskinetiken mit mehreren Phasen berichtet [20, 21]. 2-Phasen Kinetiken sind auch bei Prozessen unter Atmosphärendruck (siehe Abbildung 1.1) beobachtet worden [22, 23]. Das Auftreten der einzelnen Phasen wird durch die verschiedenen Plasmaspezies hervorgerufen. Philip et al. [20] geben in ihrer Arbeit eine Erklärung für diese Phasen, die auf der Wirkung von UV-Photonen und plasma-chemischem Ätzen basiert.

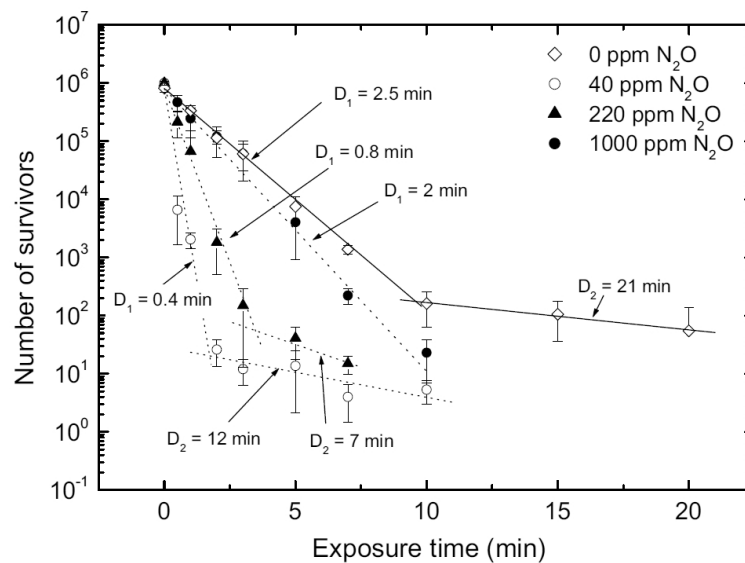
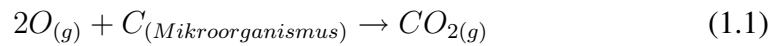


Abbildung 1.1: 2-phasige Kinetik überlebender Mikroorganismen aus direktem Plasmakontakt einer dielektrisch behinderten Entladung bei Atmosphärendruck in verschiedenen N_2O - N_2 Gemische [23]

Es sind drei grundlegende Mechanismen, die nach Philip et al. [20] in Plasmen zur Inaktivierung von Sporen beitragen. Der erste Faktor ist die direkte Zerstörung von genetischem Material durch energiereiche UV-Photonen. Weiterhin werden durch Photodesorption die Sporen erodiert. Dies geschieht durch UV-Photonen, die energiereich genug sind, um chemische Bindungen aufzubrechen und zur Bildung flüchtiger Komponenten führen. Der dritte Mechanismus ist die Erosion durch atomweises Ätzen. Reaktive Spezies aus dem Plasma gehen ständig chemische Reaktionen mit dem Material der Mikroorganismen ein und bilden flüchtige

Stoffe wie Kohlenstoffdioxid und Wasser [18] (siehe Gleichung 1.1).



Dieser Schritt kann durch UV-Photonen, welche chemische Bindungen aufbrechen, unterstützt werden. Die offenen Bindungsstellen bilden neue Anlagerungsmöglichkeiten für reaktive Spezies. Grundsätzlich finden alle Mechanismen gleichzeitig statt.

Die erste Phase ist steiler als die zweite Phase. Diese erste Phase ist durch eine direkte Inaktivierung der Mikroorganismen durch UV-Photonen geprägt. UV-Schädigung der Mikroorganismen erfolgt durch eine starke Absorption von UV-Photonen durch Nukleinsäuren, die ein Absorptionsmaximum im Bereich von 260-265 nm besitzen [24]. Auch Purinbasen sind starke Absorber für UV-Photonen. Hierbei kommt es in doppelständiger DNA zur Bildung von Dimeren der Basen Thymin und Cytosin [18–20, 24, 25], wodurch die Mikroorganismen in ihrer Replizierung gehindert werden. Viele Niederdruck- als auch Atmosphärendruckplasmen zur Sterilisation sind auf die Erzeugung von UV-Strahlung hin ausgerichtet [20, 22, 26, 27].

In der zweiten Phase der Reduktionskinetik spielen, neben der Erosion durch Photodesorption, auch Ätzeffekte eine bedeutende Rolle. Sauerstoff- und stickstoffhaltige Plasmen, im Besonderen Luft, sind Quellen für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) [18, 19, 24]. Tabelle 1.2 zeigt die für Wechselwirkungen mit Mikroorganismen wichtigsten Spezies.

In der Literatur werden überwiegend die ROS betrachtet. Diese sind auch aus der Behandlung von Polymeroberflächen bekannt [28]. Die Konsequenzen durch oxidative Schädigung von Mikroorganismen sind Eingriffe in das Abwehrsystem der Zellen, Verletzung der Zellen durch Schädigung makromolekularer Strukturen wie Lipide, DNA, Proteine und Kohlenhydrate sowie Zelltod durch exzessive irreparable Schädigung [24]. Eine besondere Bedeutung auf Grund seiner hohen Reaktivität kommt dem Hydroxylradikal (OH^\bullet) zu. Dieses hat mittlere Diffusionslängen von einigen Nanometern, so dass es direkt mit Komponenten der äußeren Hülle von Mikroorganismen reagiert. Die dabei entstehenden Radikale besitzen geringere Reaktivitäten als das Hydroxylradikal. Der von Gaunt et

Tabelle 1.2: *stabile und kurzlebige reaktive ROS und RNS in luftähnlichen Plasmen mit und ohne Feuchtigkeit [18]*

	trocken	feucht
stabil	$O_3, N_2O, N_2O_5, NO, NO_2$	$O_3, N_2O, NO, NO_2, HNO_2, HNO_3, H_2O_2$
instabil	$O, O(^1D), N, N(^2D), O_2(^1\Sigma_g^+), O_2(^1\Delta_g), N_2(A^3\Sigma_u^+), N_2(B^3\Pi_u^+)$	$O, O(^1D), N, N(^2D), OH, HO_2, O_2(^1\Sigma_g^+), O_2(^1\Delta_g), N_2(A^3\Sigma_u^+), N_2(B^3\Pi_u^+)$

al. [24] vorgestellte Reaktionsverlauf von Lipiden mit freien Radikalen (Abbildung 1.2) aus der Gasphase, weist besondere Ähnlichkeiten mit den Reaktionen zwischen Radikalen und Polymeroberflächen auf (vgl. Kapitel 1.4.2).

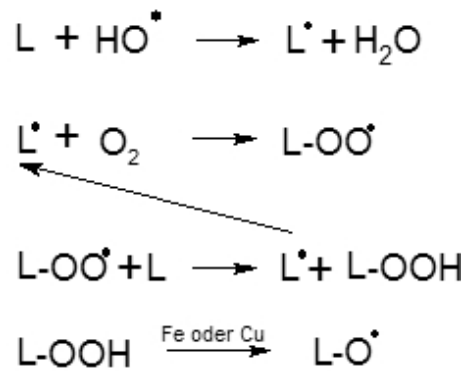


Abbildung 1.2: *Reaktionssequenz für Lipide (L) die durch freie Radikale initiiert wird [24]*

In einem ersten Reaktionsschritt werden Wasserstoffatome von den Seitenketten von ungesättigten Fettsäuren durch Radikale aus dem Plasma abgelöst. Dabei kommt es zur Bildung von Lipidradikalen L^\bullet . Durch Reaktion mit Sauerstoff werden in einem zweiten Schritt Lipidperoxylradikale $L-OO^\bullet$ gebildet, die mit an-

deren Lipiden zu neuen Lipidradikalen und Lipidhydroperoxyden $L - OOH$ reagieren und so die Reaktionen in den Ketten weiter fortsetzen. Neben der Bildung von Peroxiden können auch Aldehyde gebildet werden, welche selbst besonders reaktiv sind und Proteine schädigen können. Die Oxidation von Proteinen führt zu Veränderungen der Proteinstruktur, was funktionelle Änderungen hervorruft.

Auf direktem Weg können in der Gasphase gebildete Hydroxylradikale nicht mit der DNA reagieren, da sie auf Grund ihrer hohen Reaktivität zuvor mit anderen Makromolekülen reagieren. Hydroperoxide besitzen ein gutes Diffusionsvermögen durch Zellwände und können bei Reaktionen mit Metallionen im Inneren der Zelle OH^\bullet Radikale freisetzen, die dann auf Grund der räumlichen Nähe zur DNA mit dieser reagieren können [24]. Weiterhin ist bekannt, dass Ozon die Zellatmung beeinflusst und auch zu irreparablen Brüchen der DNA führt [19, 24]. Aus der Literatur sind zahlreiche Systeme, die bei Atmosphärendruck mit sauerstoffhaltigen Gasgemischen arbeiten bekannt, die ROS erzeugen (Plasmajets oder jetähnliche Konfigurationen [5, 29–35]; dielektrisch behinderte Entladungen und Koronasysteme [22, 25, 27, 36–40]). Auch bei Untersuchungen in Niederdruckplasmen wird von ROS berichtet [20, 21, 41–44].

Ein weiterer Mechanismus bei der Reduktion von Mikroorganismen ist die Lysis, die in Folge einer Zerstörung der Integrität der Zellmembran durch Aufladung auftritt. Die Aufladung der Zellmembran erfolgt dabei durch geladene Teilchen aus dem Plasma [45, 46]. Hierzu müssen die Mikroorganismen in direktem Kontakt mit dem Plasma sein, damit Ladungsträger aus dem Plasma die Oberfläche der Mikroorganismen erreichen können. Diese Szenerie ist besonders von gram-negativen Mikroorganismen bekannt, da diese eine sehr dünne Zellwand und oftmals irreguläre Oberflächen mit kleinen Radien der Konturen aufweisen. Wird die Oberfläche eines Mikroorganismus aufgeladen, so bildet sich ein von der Oberfläche ausgehendes elektrostatisches Feld aus. Mendis [45] gibt folgende Bedingung für das Verlieren der Zellintegrität durch Aufladung an:

$$|\Phi| \geq 0,2 \cdot \sqrt{r \cdot R} \cdot \sqrt{\frac{\Delta}{R}} F_t^{1/2} \quad (1.2)$$

Das Potential der Oberflächenladung Φ eines Mikroorganismus ist somit vom Kurvenradius R seiner Geometrie, der Dicke Δ seiner Zellmembran, dem Ra-

dius der geometrischen Irregularitäten r und der Reißfestigkeit F_t der Membran abhängig. Eine Abschätzung für Echerichia Coli mit $R = 1 \mu m$, $r = 0,02 \mu m$ und $\Delta = 8 nm$ liefert ein Oberflächenpotential, für ein Aufbrechen des Bakteriums an den geometrischen Irregularitäten von $|\Phi| \geq 6 V$. Soll das Bakterium über seine Mitte aufbrechen so ist ein Potential von $|\Phi| \sim 40 V$ notwendig.

1.2.2 Systeme und Patente

Im Kapitel 1.2.1 wurden die Mechanismen, welche bei der Plasmasterilisation zum Tragen kommen, dargestellt. Die dort genannte Literatur berichtet nur über grundlegende Wirkungsweisen verschiedener Plasmaquellen unter verschiedenen Atmosphären und Bedingungen.

Einen Überblick der in der Praxis befindlichen Plasmasterilisationsverfahren und einiger Patente ist bei Moisan [3] zu finden. Das erste Patent im Bereich der Sterilisation mit physikalischen Gasplasmen wurde 1968 von Menashi angemeldet. Dieses Patent beschreibt die Sterilisation von Vials mittels eines Argonplasmas bei Atmosphärendruck. Weitere Patente von Ashman und Menashi (1972), Boucher (1980) und Bithell (1982) folgten. Diese Verfahren beruhten zumeist auf Edelgasplasmen im Niederdruckbereich.

Zwei plasmaunterstützte Verfahren, die in die klinische Praxis eingeführt wurden, sind das Sterrad[®] (Patent US 4.643.876) und das Plazlyte[®] (Patent US 5.413.760) Verfahren. Beide beruhen auf der Kondensation von Wasserstoffperoxid oder Peressigsäure auf den Mikroorganismen und Oberflächen [3] bei reduzierten Drücken.

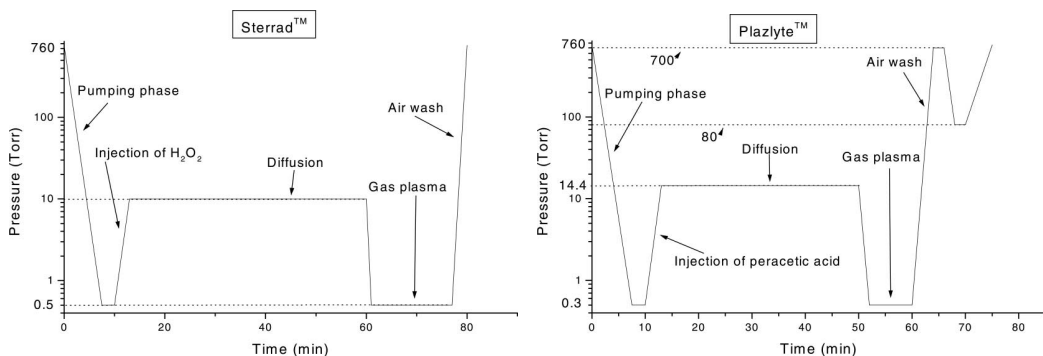


Abbildung 1.3: Prozessablauf des Sterrad[®] und Plazlyte[®] Verfahren aus [3]

In beiden Prozessen schließt sich an die Diffusionsphase, in der die zugesetzten Sterilisationsmittel in die Mikroorganismen hineinpenetrieren und reagieren können, eine Plasmaphase an. Nach Krebs et al. [47] hat das Plasma hier aber keine biozide Wirkung, so dass man bei diesen Verfahren nicht von Plasmasterilisation sprechen kann. Das Plasma dient sowohl beim Sterrad[®] als auch beim Plazlyte[®] Verfahren nur zur Beseitigung gefährlicher Rückstände. Nach Rutalla et al. [48] liegt der Vorteil dieser Verfahren darin, dass sie keine gefährlichen Rückstände auf den sterilisierten Gütern hinterlassen und sicher für die Umwelt und die Mitarbeiter im Gesundheitswesen sind. Die Nachteile sind, dass keine Flüssigkeiten oder vakuumsensitiven Materialien behandelt werden können. Auch können beim Sterrad[®] Verfahren keine zellulosehaltigen Materialien sterilisiert werden, da diese Materialien zu stark Wasserstoffperoxid absorbierend sind, welches dann nur schlecht durch das Plasma wieder entfernt werden kann. Weiterhin kann in Plazlyte[®] Systemen nur chirurgisches Besteck aus nicht-rostenden Stählen sterilisiert werden. Für das Plazlyte[®] System wurde 1998 eine Warnung der U.S. Food and Drug Administration ausgegeben, nachdem nachweislich 10 Patienten unter Komplikationen nach Augenoperationen, bei denen mit Plazlyte[®] sterilisiertes chirurgisches Besteck gearbeitet wurde, litten [49].

Die Firma Cerionx, Inc. (USA), die inzwischen ihre Geschäftstätigkeit eingestellt hat, brachte 2005 das plasmabasiertes Reinigungssystem TipCharger[™] für automatisierte Pipettiersysteme auf den Markt. Durch die Patente wird die Reinigung und Konditionierung von Pipettenspitzen auch in Auslegung von Pipettierköpfen bis zur Größe von 1536-Wellplatten rechtlich gesichert (Patente US 6.724.608, US 7.017.594). Zur Anwendung werden hier verschiedene Konfigurationen der dielektrisch behinderten Entladung gebracht. Es können sowohl elektrisch leitende als auch nichtleitende Pipettenspitzen behandelt werden die in das System eingeführt werden. Die Verwendung anderer Gase als Luft und andere Drücke als Atmosphärendruck werden nicht explizit ausgeschlossen.

1.3 Atmosphärendruckplasmen

Nichtthermische Plasmen bei Atmosphärendruck können auf die vielfältigsten Weisen erzeugt werden. Die Anregungsfrequenzen reichen dabei vom Hz- bis in den GHz-Bereich hinein. Neben jetähnlichen Konfigurationen sind dielektrisch behinderte Entladungen eine häufig verwendete Form.

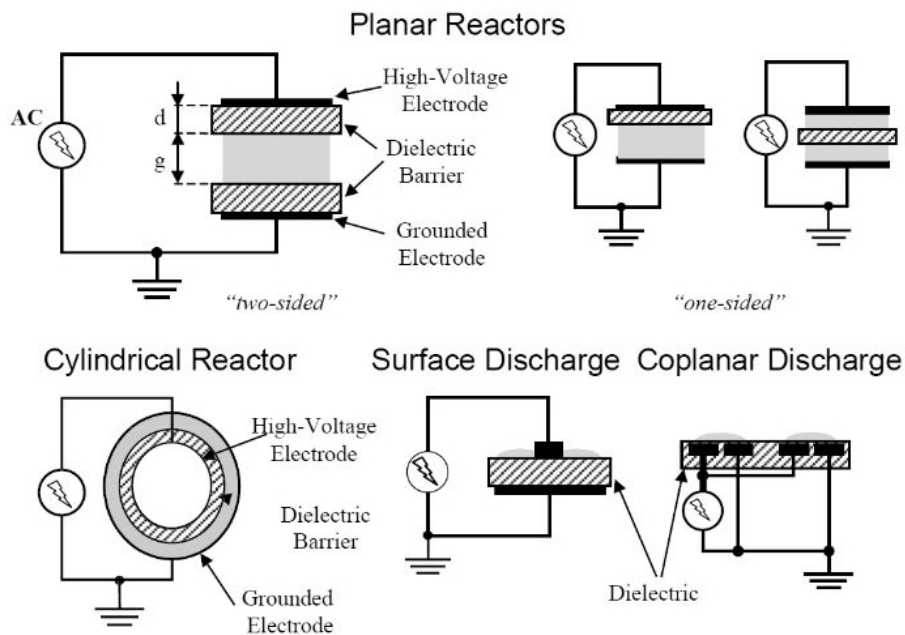


Abbildung 1.4: Konfigurationen von dielektrisch behinderten Entladungen, oben: planare Volumenentladung, unten links: zylindrische Volumenentladung, unten mittig: Oberflächenentladung, unten rechts: coplanare Entladung [10]

Wie in Abbildung 1.4 gezeigt, gibt es eine Vielzahl an DBE-Konfigurationen. Alle Konfigurationen bestehen aus zwei Elektroden, die durch mindestens ein Dielektrikum getrennt sind. Anders als bei den Volumenentladungen befinden sich bei der Oberflächenentladung beide Elektroden direkt auf einem Dielektrikum. Bei der coplanaren Entladung sind die Elektroden im Dielektrikum eingebettet.

Eine weitere Atmosphärendruckplasmaquelle ist die Koronaentladung. Hier entstehen an geometrisch exponierten Stellen, wie Spitzen und dünnen Drähten, sehr

hohe elektrische Feldstärken. In den Bereichen dieser hohen Feldstärken bildet sich das Plasma aus.

Im folgenden werden die physikalischen Eigenschaften der dielektrisch behinderten Oberflächenentladung und der Koronaentladungen genauer beschrieben.

1.3.1 Dielektrisch behinderte Plasmen

Bei der dielektrisch behinderten Oberflächenentladung handelt es sich um eine Anordnung, in der es keinen definierten Spalt zwischen den Elektroden gibt. Sowohl die flächenhafte Elektrode auf der Unterseite des Dielektrikums, als auch die fingerartige Elektrode auf der Oberseite sind im direkten Kontakt mit dem Dielektrikum. In nur wenigen Arbeiten [50–58] lassen sich zu diesem System, anders als im Fall der Volumenentladung, experimentelle Befunde und Modellbeschreibungen finden.

Abbildung 1.5 (aus [52]) zeigt das Verhalten einer Oberflächenentladung beim Anlegen einer ansteigenden Hochspannung. Wie aus dieser Abbildung hervor-

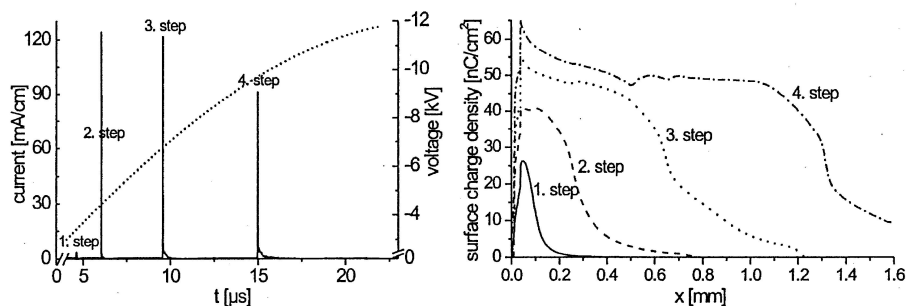


Abbildung 1.5: Entladungsströme mit steigender Spannung (links) und Oberflächenladung nach jedem Schritt (rechts), aus einer Arbeit von Humpert und Pietsch [52]

geht, findet die Oberflächentladung in Schritten, mit steigender Spannung, statt. Die Entladung startet immer im Paschen-Minimum. In jedem Schritt der Entladung sammeln sich Ladungsträger auf der Oberfläche des Dielektrikums an und reduzieren die elektrische Feldstärke so stark, dass die Entladung stoppt. Durch das Ansteigen der Spannung werden weitere dieser Entladungsschritte initiiert,

bis das Maximum der Spannung erreicht ist. Es gibt zwei Gebiete, in denen die Feldstärke ein Maximum besitzt. Eines dieser Maxima befindet sich direkt an dem Punkt, an welchem Elektrode, Gasraum und Dielektrikum zusammenstoßen. Das zweite Maximum befindet sich an der Spitze der Entladung. Nur in diesen Gebieten findet im Wesentlichen die Ladungsträgervervielfachung statt. Die erzeugten Ladungsträger können sich zwischen den beiden Maxima der elektrischen Feldstärke bewegen, ohne weitere signifikante Vervielfachungen zu erfahren [52]. Durch das schrittweise Aufladen der Oberfläche, ausgehend senkrecht von der Elektrode, kommt es nach Durchlaufen der Maximalspannung zu einem Anstieg der elektrischen Feldstärke, in umgekehrter Richtung, zwischen den Oberflächenladungen und der fingerartigen Elektrode auf der Oberfläche. Nach Erreichen einer kritischen Feldstärke kommt es zum Durchbruch und eine rückwärtige Entladung findet statt.

Die Entladungsmuster auf der Oberfläche hängen von der Polarität der Hochspannung ab [51, 55, 56]. Bei einer positiven Polarität kommt es, ausgehend von der Elektrode, zu verschiedenartigen Entladungskanälen, wohingegen bei negativer Polarität eine homogene Entladungszone vorherrscht. In beiden Fällen kommt es, unter den schon genannten Bedingungen, zu rückwärtigen Entladungen, in der Form ihrer entgegengesetzten Polarität. Ein mathematisches Modell für die in Abbildung B.2 gezeigte dielektrisch behinderte Oberflächenentladung ist in der Arbeit von Ouyang et al. [54] zu finden. In dieser Arbeit [54] wird ein elektrisches Modell für den Oberflächenentladungs-induzierten plasmachemischen-Prozess (SPCP, surface discharge induced plasma chemical process) vorgestellt und an experimentellen Ergebnissen verifiziert. Dieses Modell soll im vorliegenden Kapitel in seinen wesentlichen Zügen, wenn nicht anders gekennzeichnet, dargestellt werden.

Die Anordnung, welche verwendet wurde, ist eine Struktur mit nur einem leitenden Streifen als Elektrode. Die Dicke dieser Elektrode hat dabei keinen bedeutenden Einfluss auf die Länge der Entladungen, welche von ihr ausgehen.

Die Größen $C_{pi}(i=1,2,3,...)=C_p$ stellen die keramischen Kapazitäten des Dielektrikums mit einer Breite von Δx da. Analog bilden $C_{gi}(i=1,2,3,...)=C_g$ die Gas-kapazitäten (siehe Abbildung 1.6). Wird der Spannungsunterschied über die Gas-

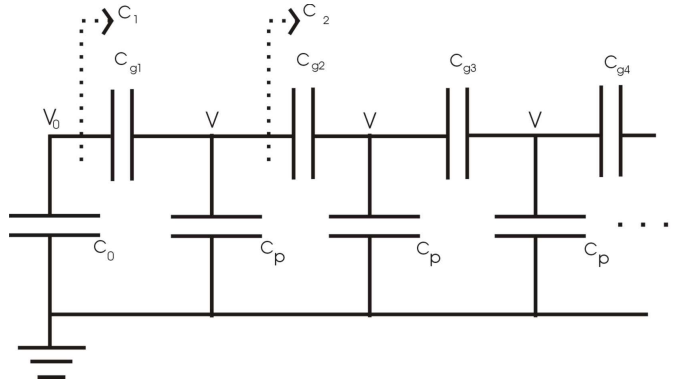


Abbildung 1.6: Ein für das SPCP Element äquivalenter Schaltkreis [54]

kapazität größer als ein Spannungswert V_{cr} (kritischer Wert), so kommt es zum Durchbruch und einer damit verbundenen Entladung. C_0 ist eine für das System konstante Kapazität. Die beiden Kondensatoren C_1 und C_2 ergeben sich wie in Gleichung 1.3 und 1.4 gezeigt.

$$C_1 = \frac{1}{2} \left(-C_p + (C_p^2 + 4C_g C_p)^{\frac{1}{2}} \right) \quad (1.3)$$

$$C_2 = \frac{1}{2} \left(C_p + (C_p^2 + 4C_g C_p)^{\frac{1}{2}} \right) \quad (1.4)$$

Der Strom, welcher beim Zusammenbrechen der Kondensatoren fließt, setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: den Oberflächenladungen (Elektronen und Ionen) und Polarisationsladungen. Dieses Modell berücksichtigt jedoch kein ohmschen Beiträge beim Zusammenbrechen der Kapazitäten (vergleiche Abbildung 1.9 in Kapitel 1.5.1).

Das Potenzial, welches sich an jedem einzelnen C_{pi} befindet, lässt sich nach Gleichung 1.5 berechnen.

$$V_i = V_0 \left(\frac{C_1}{C_2} \right)^i \quad (1.5)$$

Wird ein kritischer Wert für die Spannung $V_p = V_{th}$ überschritten, so bricht C_{g1} zusammen und die Entladung startet. V_p ist die Maximalamplitude der Spannung, welche vom Hochspannungsgenerator in die Oberflächenentladung eingespeist wird. Somit ergibt sich für V_{th} ein Zusammenhang nach Gleichung 1.6.

$$V_{th} = \frac{C_g}{C_1} V_{cr} \quad (1.6)$$

Wie aus dieser Gleichung erkennbar, ist die Schwellwertspannung V_{th} eine Funktion der Gaskapazität C_g , C_1 und der kritischen Spannung V_{cr} , die von den Eigenschaften des Dielektrikums abhängig sind.

Ist das Maximum der Spannung durchlaufen und die Entladung erloschen, bleiben die Oberflächenladungen bis zur nächsten Entladung auf der Oberfläche erhalten. Durch diese Oberflächenladungen kommt es, dass C_{g1} unterhalb der Schwellwertspannung V_{th} zusammenbricht und die Entladung startet. Diese geringere Spannung V_b ist abhängig von der Maximalspannung, welche in die Anordnung eingekoppelt wird. In Gleichung 1.7 ist der mathematische Zusammenhang zwischen den Kapazitäten des Systems, der Maximalspannung und der Schwellwertspannung dargestellt.

$$V_b = \frac{C_g}{C_1} \left(-V_p + \left(1 + \frac{C_1}{C_g} \right) V_{th} \right) \quad (1.7)$$

Die Reichweite der Entladungsstrukturen, senkrecht ausgehend von der Oberflächelektrode, wird unter Zuhilfenahme von $E_{cr} \Delta x = V_{cr}$ durch Gleichung 1.8 beschrieben. Die Konstante C ist für das System spezifisch, und wird in der Arbeit von Jiting et al. [54] nicht genauer erläutert.

$$L = \frac{V_p}{E_{cr}} + C \quad (1.8)$$

Aus Gleichung 1.8 lässt sich erkennen, dass die Länge der Entladungsstrukturen direkt proportional der Maximalamplitude der Versorgungsspannung ist. Diese Gleichung wird durch experimentelle Daten, in der gleichen Arbeit, bestätigt. Gestützt wird der Zusammenhang zwischen Maximalspannung und der Länge der Entladungsstrukturen auch durch eine Arbeit von Kiss und Masuda [59].

Die Summe der Oberflächenladungen Q_T in jedem Halbzyklus einer sinusförmigen Spannung ist eine Funktion in zweiter Potenz der Länge der Entladungsstrukturen (siehe Gleichung 1.9).

$$Q_T = 2E_{cr}C_sL^2l \quad (1.9)$$

C_s ist die keramische Kapazität einer Einheitsfläche.

Für einen plasmachemischen Prozess ist die effektive Leistung, also die Leistung, welche in das Plasma eingekoppelt wird, von Interesse. In Ouyang et al. [54] wird die effektive Leistung als Funktion der dritten Potenz der Maximalspannung angegeben (siehe Gleichung 1.10).

$$P_{eff} = \frac{1}{6E_{cr}} f C_s l (2V_p + C')^3 \quad (1.10)$$

Die effektive Leistung ist somit proportional zur Frequenz f der angelegten Spannung und der Länge der Oberflächenelektrode. Weiterhin ist sie umgekehrt proportional zur kritischen elektrischen Feldstärke und damit abhängig von dem Gas, welches sich oberhalb der Elektrode befindet. Der Zusammenhang zwischen der Maximalspannung V_p und der effektiven Leistung E_{eff} wird ebenfalls durch experimentelle Ergebnisse von Ouyang et al. [54] bestätigt. Eine Bestätigung, dass es sich nicht um einen linearen Zusammenhang zwischen V_p und P_{eff} handelt, ist in einer Arbeit von Haacke und Pietsch [50] zu finden. In dieser Arbeit hat man auch aus experimentellen Daten einen Zusammenhang zwischen der effektiven Leistung und den Geometrieparametern des Dielektrikums gefunden (Gleichung 1.11).

$$P \sim \left(\frac{\varepsilon_r}{d_D} \right)^{1,5} \quad (1.11)$$

Die Größe ε_r ist hierbei die Dielektrizitätskonstante und d_D die Dicke des Dielektrikums.

Auch die Geometrie der Oberflächenelektrode ist von großer Bedeutung. Finantudin et al. [57] haben Untersuchungen an zwei verschiedenen Geometrien durchgeführt. Der Vergleich zwischen einer fingerartigen Struktur und einer Lochstruktur

tur hat gezeigt, dass im Fall der fingerartigen Struktur die Entladung schon bei kleineren Spannungen zündet. Hierbei finden mehr Einzelentladungen mit einem größerem Ladungstransport statt, als im Fall der Lochstruktur. Teschke et al. [58] fanden in Untersuchungen zum Verhalten der Geometrie der Ecken von Oberflächenelektroden, dass es an exponierten Ecken zu Streamern kommt, die sich ständig wiederholen.

Naude et al. [60] fanden heraus, dass es eine starke Kopplung zwischen der Elektrodenanordnung und der Spannungsversorgung gibt. Da die Elektrode mit den Zuleitungen vom Generator einen Schwingkreis bildet, kommt es zu Rückkopplungen auf den Generator. Im Gegenzug wirken sich parasitäre Kapazitäten des Generators auf die Entladung aus. Das Wechselspiel zwischen Elektrode, Zuleitungen und Generator kann sich destabilisierend auf die Entladungen auswirken.

Wie in den dargestellten Zusammenhängen gezeigt, ist die Entladung in ihren Strukturen und Eigenschaften stark von materiellen Eigenschaften der Elektrodenkonfiguration sowie von der angelegten Spannung und der Spannungsquelle abhängig.

1.3.2 Koronaentladung

Koronaentladungen sind ein Phänomen der Feldüberhöhung, welches in Bereichen wie zum Beispiel an Spitzen, Kanten oder Leitungen, auftritt. In der Elektrotechnik werden Platte-Spitze Systeme zur Bestimmung von Isolationseigenschaften bestimmter Werkstoffe eingesetzt. Auch hier treten zunächst Koronaentladungen auf. In der Natur können sie als Sankt-Elms-Feuer beobachtet werden.

Ist der koronale Strom genügend groß, kann die Korona von einer Dunkelentladung zu einer für das menschliche Auge sichtbaren Entladung übergehen. Im Gegensatz zu Funkenentladungen und elektrischen Durchschlägen, welche transiente Ereignisse mit hohen Strömen sind, ist die Koronaentladung ein andauerndes Phänomen mit um Größenordnungen kleineren Strömen.

Für trockene Luft ergibt sich eine Zündspannung, für eine Anordnung bestehend

aus planen, parallelen Elektroden im Abstand d von [61]

$$V_{zuend} = 3000d + 1,35kV \quad (1.12)$$

Daraus ergibt sich für das für die Zündung erforderliche Feld

$$E_{zuend} = \frac{V_{zuend}}{d} = 3000 + \frac{1,35}{d} \frac{kV}{m} \quad (1.13)$$

Überschreitet das lokale elektrische Feld in trockener Luft bei Atmosphärendruck eine Feldstärke von mehr als $3000 \frac{V}{mm}$, so kann eine Entladung zünden. Ist die angelegte Hochspannung V_0 größer als die notwendige Zündspannung, so wird ausgehend vom Punkt der größten Feldstärke, die Koronaentladung initiiert. Diese kann sich dann bis zu einem aktiven Radius r_{Korona} ausbreiten. An diesem Punkt ist das elektrische Feld bis auf die Zündfeldstärke E_{zuend} abgefallen. Der Bereich, in dem sich die Koronaentladung ausbreitet, wird auch als aktives Volumen bezeichnet.

Koronaentladungen können sowohl für negative als auch positive Polaritäten auftreten. Industriell werden Koronaentladungen auch mit Wechselspannungen erzeugt. Die wohl größte Anwendung finden Koronaentladungen in der Erzeugung von Ozon zur Trinkwasseraufbereitung.

Ausgehend von einer sphärischen Symmetrie, wie es bei einer scharfen Spitze umgeben von einer sphärischen geerdeten Elektrode auftritt, ist das elektrische Feld nur eine Funktion des Radius.

$$r^2 E(r) = konstant \quad (1.14)$$

Somit gilt Gleichung 1.15 für die Radien r_0 für den aktiven Radius, r_{Spitze} für den Radius der Spitze und r_{Wand} für den Radius zur geerdeten Elektrode

$$r^2 E = r_{Spitze}^2 E_{Spitze} = r_{Korona}^2 E_{Korona} = r_{Wand}^2 E_{Wand} \quad (1.15)$$

E_{Spitze} , E_{Korona} und E_{Wand} entsprechen dabei den elektrischen Feldstärken an den zugeordneten Orten der Radien. In Abhängigkeit der verschiedenen ein-

geführten Radien ergibt sich für das elektrische Feld folgende Gleichung

$$E(r) = \frac{r_{Spitze} r_{Wand} V_0}{r^2 (r_{Wand} - r_{Spitze})} \quad (1.16)$$

In der Praxis ist für den Effekt der Behandlung die Dimensionierung eines Koronasystems von Bedeutung. Der maximale aktive Radius r_{Korona} , der bei einer angelegten Spannung V_0 in einer Punkt zu Fläche Geometrie erzielt werden kann, leitet sich aus Gleichung 1.16 ab. Unter Verwendung der Zündfeldstärke kann dieser für gegebene Bedingungen und der Annahme, dass der Abstand zur geerdeten Elektrode groß gegenüber dem Spitzenradius ist, $r_{Spitze} \ll r_{Wand}$, errechnet werden.

$$r_{Korona} \approx \sqrt{\frac{r_{Spitze} V_0}{E_{zuend}}} \quad (1.17)$$

Entladungen in Anordnungen mit großem Elektrodenabstand können sich mit einer größeren Geschwindigkeit ausbreiten, als es mit der Ausbreitung von Elektronenlawinen erklärt werden kann. Wird ein kritischer Wert an Elektronen im Kopf der Lawine überschritten, und zwar bevor die Elektronenlawine die Anode erreicht und die Bedingung des ungestörten, homogenen, äußeren, elektrischen Feldes nicht mehr gilt, greift das Konzept der Streamerentladung. Streamerentladungen laufen deutlich schneller ab und äußern sich in dünnen Entladungskanälen. Die Grundlage der Streamerentladung basiert darauf, dass sich der Streamer durch Ionisation des Gases durch das vom Kopf der Entladung erzeugte hohe elektrische Feld ausbreitet. Streamerentladungen können durch gepulste Überspannungen erzeugt werden [62, 63] und breiten sich undefiniert in Richtung des elektrischen Feldes aus, auch wenn die lokale Feldstärke mit $500 \frac{V}{m}$ unterhalb der Zündfeldstärke liegt [64].

1.4 Plasmachemie von Luftplasmen

Um die durch Plasmen an Oberflächen hervorgerufenen chemischen Veränderungen verstehen zu können, muss man die im Plasma und an den Oberflächen ablaufenden chemischen Reaktionen genauer betrachten. Zellkulturprodukte werden im industriellen Maßstab zunächst in sauerstoffhaltigen Plasmen funktionalisiert. Dabei findet eine Oxidation der Oberfläche statt, bei der Hydroxyl-, Carbonyl- und Carboxylgruppen in die obersten Schichten der Polystyroloberfläche eingebunden werden [65–67]. Neben den Plasmabehandlungen werden auch andere Verfahren, wie zum Beispiel mit UV-Licht und Ozon oder Elektronenstrahlen zur Funktionalisierung der Oberflächen untersucht [68, 69]. Zellkulturprodukte können zusätzlich mit besonderen Schichten wie zum Beispiel Poly-D-lysin oder Kollagen ausgestattet sein. In einem weiteren Prozess werden sie mittels Elektronenstrahlen oder Gammastrahlung sterilisiert.

Für eine gezielte Funktionalisierung und antimikrobielle Behandlung der Polystyroloberflächen mittels Plasma, müssen vom Plasma induzierte Prozesse in der Gasphase und an den Oberflächen berücksichtigt werden. In Kapitel 1.4.1 werden die in feuchten Luftplasmen ablaufenden Reaktionen und entstehenden Spezies betrachtet, wohingegen sich Kapitel 1.4.2 mit der Beschreibung der Wechselwirkungen der im Plasma gebildeten Spezies mit der Polystyroloberfläche befasst.

1.4.1 Gasphase

Die Gasphasenchemie wird durch die energetischen Elektronen des Plasmas initiiert und führt zur Bildung von Ionen, Radikalen und anderen neutralen Spezies. Entsprechend des Zeitpunktes im Entladungszyklus liegt eine unterschiedliche Zusammensetzung der Gasphase vor. Ionen, Radikale und angeregte Spezies, die zuerst im Plasma gebildet werden, führen zu einer Vielzahl an chemischen Umwandlungen. Solche Umwandlungen sind positiver Ladungstransfer, positive Ionen - Elektronen Rekombination, positive Ionen - negative Ionen Rekombination, Ionen - Neutralmolekül Reaktionen, Reaktionen angeregter Spezies, Radikal - Radikal und Radikal - Neutralteilchen Reaktionen, Vibrationsanregungen und Vibrations - Translations Abregung. Die Vielzahl der Ionen - Neutralteilchen Reak-

tionen erzeugt eine Mischung sekundärer Teilchen aus einfachen und komplexen positiven und negativen Ionen. Elektronen - Ionen und Ionen - Ionen Rekombinationen führen in Abhängigkeit vom Plasmagas und der Ionisation des Gases zu neutralen Sekundärteilchen [70]. Für trockene Luft, nur bestehend aus Stickstoff und Sauerstoff, sind zahlreiche Reaktionsschemata in Samoilovich et al. und Becker et al. [62, 71] aufgeführt.

Trockene Luft ist in realen Prozessen kaum vorzufinden, da Feuchtigkeit an allen Oberflächen anhaftet und sowohl Umgebungsluft als auch aus der Druckluftversorgung zugeführte Luft bestimmte Anteile an Feuchtigkeit enthalten. Eine Reaktionsmatrix von neutralen Spezies in feuchter Luft ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

	M	O	O ₂	O ₃	N	N ₂	NO	NO ₂	NO ₃	N ₂ O	N ₂ O ₃	N ₂ O ₄	N ₂ O ₅	H	H ₂	HO	HO ₂	H ₂ O	H ₂ O ₂	HN	HNO	HONO	HONO ₂	HO ₂ NO ₂	O(¹ D)	O(¹ S)	O ₂ (¹ Δ _g)	O ₂ (¹ Σ _g ⁺)	N(² D)	N(² P)	N ₂ (A ³ Σ _u ⁺)
M																															
O																															
O ₂																															
O ₃																															
N																															
N ₂																															
NO																															
NO ₂																															
NO ₃																															
N ₂ O																															
N ₂ O ₃																															
N ₂ O ₄																															
N ₂ O ₅																															
H																															
H ₂																															
HO																															
HO ₂																															
H ₂ O																															
H ₂ O ₂																															
HN																															
HNO																															
HONO																															
HONO ₂																															
HO ₂ NO ₂																															
O(¹ D)																															
O(¹ S)																															
O ₂ (¹ Δ _g)																															
O ₂ (¹ Σ _g ⁺)																															
N(² D)																															
N(² P)																															
N ₂ (A ³ Σ _u ⁺)																															

Abbildung 1.7: Reaktionsmatrix für ausgewählte neutrale Spezies in feuchter Luft aus Herron et al. [72], schwarze Felder sind Reaktionen mit geringer Wahrscheinlichkeit für nicht-thermische Plasmen, weiße Felder entsprechen potenziell wichtigen Reaktionen, die mit Haken markierten Felder sind im Modell [72] enthalten

Einen guten Überblick über die Zeitskalen, in der mögliche Reaktionen im Plasma ablaufen, ist bei Wagner et al. [10] und Eliasson et al. [73] zu finden. Betrachtet

man zunächst einen einzelnen Entladungspuls, so nimmt die Zahl der Elektronen und Ionen sehr schnell ab und es bleiben angeregte (z.B. $O(^1D)$, $N(^2D)$, $O_2(^1\Delta_g)$ und $N_2(A^3\Sigma_u^+)$) sowie neutrale im Grundzustand (z.B. $O(^3P)$, $N(^4S)$, OH , NO und HO_2) befindliche Spezies zurück. Diese hoch reaktiven angeregten Spezies haben zum Teil Lebensdauern im Bereich weniger Mikrosekunden, sind aber für viele weitere Reaktionen mit N_2 , O_2 und H_2O von großer Bedeutung [72]. In Dorai et al. [28] sind wesentliche Reaktionen geladener Teilchensorten und freier Radikale schematisch dargestellt (siehe Abbildung 1.8).

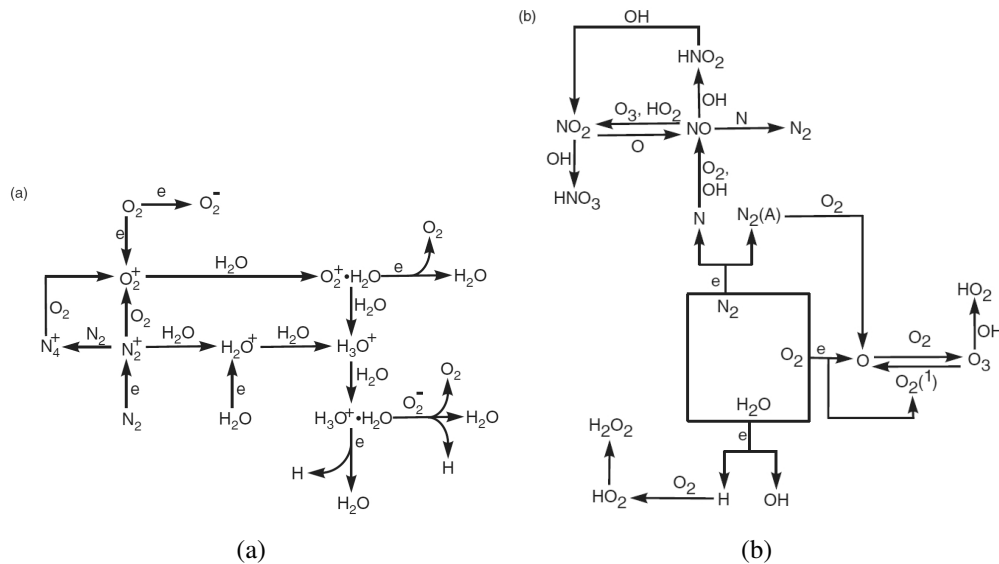


Abbildung 1.8: Reaktionsmechanismen in der Gasphase für a.) geladene Spezies und b.) freie Radikale in feuchter Luft [28]

Wie besonders aus Abbildung 1.8b erkennbar, ist das Hydroxylradikal an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt. Dies liegt in seiner besonders hohen Reaktivität begründet. Darauf wurde mit Hinblick auf die Keimreduktion auch in Hähnel et al. [4] hingewiesen. Die Konzentration an Hydroxylradikalen nimmt mit steigender Feuchtigkeit zu, wohin gegen die Konzentrationen an atomaren Sauerstoff, Ozon und Lachgas deutlich sinken. Die Anteile an Stickstoffmonoxid und Stickstoffdioxid steigen hingegen leicht mit zunehmender Luftfeuchte an, was mit einer Zunahme der Konzentrationen an salpetriger Säure und Salpetersäure einher

geht [28].

Neben der Luftfeuchtigkeit hat auch die elektrische Feldstärke in der Entladungsgeometrie Einfluss auf die Konzentration der Hydroxylradikalkonzentration [74]. Eine Zunahme der elektrischen Feldstärke führt zu einer höheren Konzentration an Hydroxylradikalen. In der von Soloshenko et al. vorgestellten Arbeit durchläuft die Konzentration der Hydroxylradikale zwei Millisekunden nach Anlegen einer Hochspannung, an die Entladungsstruktur, ihr Maximum. Berechnungen der Konzentrationen an Ozon, Stickstoffoxiden und deren Säuren zeigen nur unterhalb von $20 \frac{kV}{cm}$ eine Zunahme mit steigender elektrischer Feldstärke [74]. Eine genaue quantitative Bestimmung der Hydroxylradikalkonzentration über größere Konzentrationsbereiche in der Entladungszone ist nur mit aufwändiger Laserinduzierter Fluoreszenz möglich [75–80].

1.4.2 Polymeroberflächen

In vielen Bereichen werden die verschiedensten Materialien durch Polymere ersetzt, da sie bei geringerem Gewicht oftmals gleiche oder bessere mechanische, optische oder Gebrauchseigenschaften besitzen. Jedoch verfügen Polymere nur über geringe Oberflächenenergien, was das Bedrucken oder Verkleben erschwert und zusätzliche Verfahren zur Erhöhung der Oberflächenenergie notwendig macht. So gibt es eine Reihe von industriell anwendbaren Plasmaprozessen, mit denen Polymere im Niederdruck und vermehrt auch bei Atmosphärendruck behandelt werden. Die dabei durch die Plasmabehandlungen erzielten Veränderungen sind nur auf oberflächennahe Bereiche beschränkt.

Zunehmend werden Kunststoffe in der Biologie und Medizin in diagnostischen Bereichen eingesetzt, da sich aus ihnen günstige Einwegartikel herstellen lassen. Aufwändige Reinigungsschritte zur Wiederverwendung entfallen. Das bevorzugte Polymer für diese Zwecke ist Polystyrol. Polystyrol (IUPAC: Poly(1-phenylethan-1,2-diyl)) ist ein transparenter Thermoplast, der durch Polymerisation von Styrol gewonnen wird. Die Einsatztemperatur sollte auf Grund einer beschleunigten Alterung und des Verlusts der mechanischen Eigenschaften $55^\circ C$ nicht übersteigen. Polystyrol besitzt jedoch für die Adhäsion von Zellen eine zu geringe Oberflächenenergie, so dass auch hier chemische oder plasmachemische Vorbehand-

lungen notwendig sind.

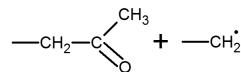
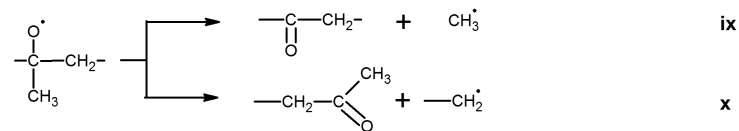
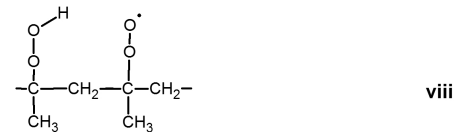
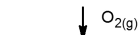
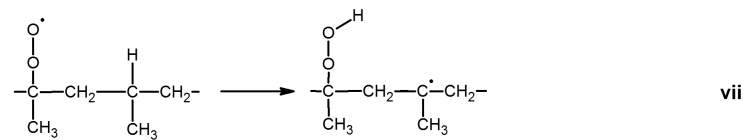
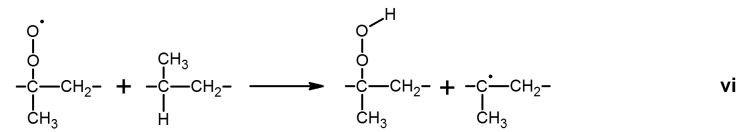
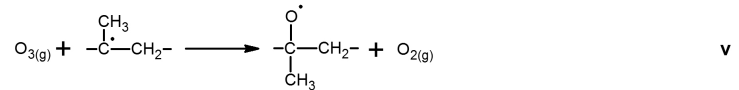
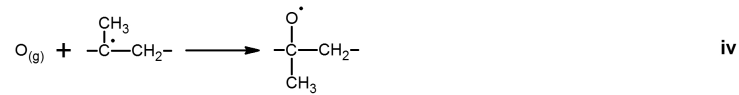
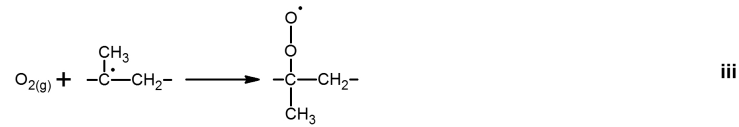
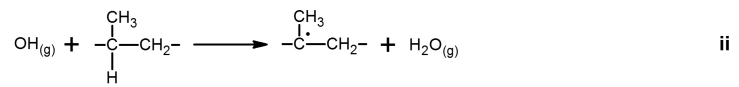
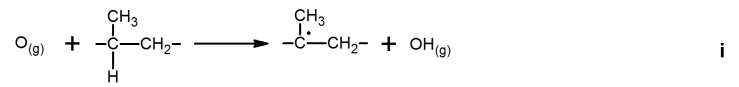
Ein umfassendes Modell zur Plasmabehandlung von Polypropylen bei Atmosphärendruck in feuchter Luft wird von Dorai und Kushner [28] vorgestellt. Neben den Gasphasenreaktionen 1.4.1 werden auch Oberflächenprozesse am Beispiel von Polypropylen detailliert beschrieben und verallgemeinert für Polymere aus reinen Kohlenwasserstoffen dargestellt. Wenn nicht anders ausgewiesen, beziehen sich die hier verwendeten Reaktionsgleichungen auf Tabelle 1.3.

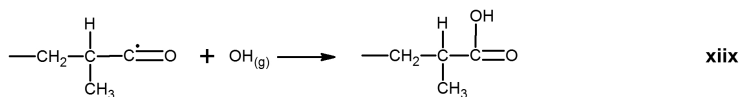
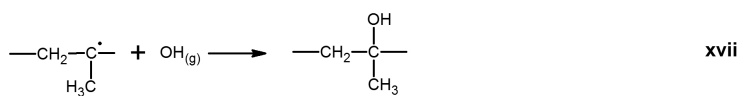
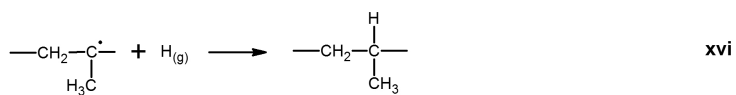
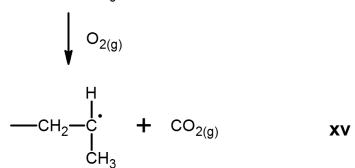
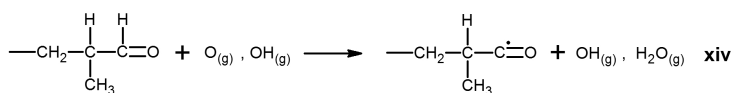
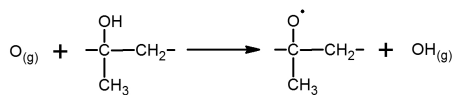
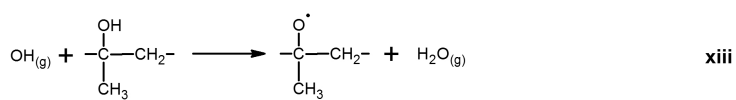
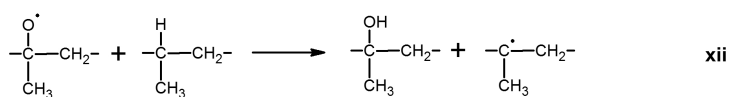
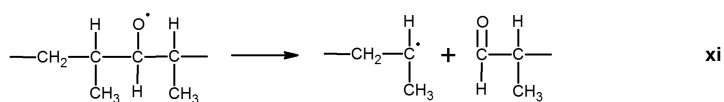
In der ersten Phase werden Wasserstoffatome vom Polymer abgetrennt. Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit für das Abtrennen vom tertiären über den sekundären hin zum primären Wasserstoff ab. Atomarer Sauerstoff (Gleichung i) und OH Radikale (Gleichung ii) sind die maßgeblich an diesem Prozess beteiligten Plasmaspezies. Ionen aus dem Plasma können vernachlässigt werden, da ihr Strom in Richtung der Polymeroberfläche aus dem Plasma heraus um einige Größenordnungen kleiner ist als für die Radikale [28]. Die so entstandenen Alkylradikale können in der nächsten Phase mit molekularem Sauerstoff (Gleichung iii), atomarem Sauerstoff (Gleichung iv) oder Ozon (Gleichung v) aus der Gasphase reagieren. Dabei kommt es zur Bildung von Peroxyradikalen oder Alkoxyradikalen. Die Reaktion zwischen Ozon und Polymeralkylradikalen läuft um bis zu Faktor 5 häufiger ab als mit O_2 . Bei der Reaktion der Polymeralkoxyradikalen mit O_2 sind Reaktionen mit endständigen Radikalen bevorzugter als Reaktionen mit Radikalen in der Polymerkette [81].

Die entstandenen Peroxyradikale können mit benachbarten Wasserstoffatomen der gleichen Kette über intermolekulare Wechselwirkungen reagieren (Gleichung vi). Dabei entstehen zum einen Polypropylenhydroperoxid und Alkylradikal, welches mit O_2 wieder zu einem Peroxyradikal reagieren kann. Die Hydroperoxidgruppen werden durch eine weitere Zersetzung in eine Vielzahl anderer Verbindungen umgewandelt. Diese Reaktionen laufen aber um ein Vielfaches langsamer als die Bildung der Hydroperoxide.

Die Polymeralkoxyradikale sind die Hauptursache der β -Spaltung der Ketten im Volumen des Polymers. Eine β -Spaltung an tertiären Kohlenstoffatomen führt zur Bildung von Ketonen (Gleichung ix und x), während eine β -Spaltung an sekundären Kohlenstoffatomen zur Bildung von Aldehyden (Gleichung xi) führt.

Tabelle 1.3: Übersicht der chemischen Oberflächenreaktionen am Beispiel von Polypropylen nach [28]





Vom Polypropylen ist bekannt, dass 65 Prozent der Alkoxyradikale durch β -Spaltung wieder in andere Verbindungen umgewandelt werden. Die verbleibenden Alkoxygruppen werden zu Alkoholen umgewandelt (Gleichung xii) die wiederum bei Reaktionen mit atomarem Sauerstoff und Hydroxylradikalen aus der Gasphase wieder Alkoxyradikale bilden (Gleichungen xii). In einer Art von Verbrennungsreaktion wird in einem ersten Schritt durch atomaren Sauerstoff oder OH-Radikale das Wasserstoffatom von der Aldehydgruppe abgetrennt. Im zweiten Schritt wird durch eine erneute Reaktion mit Sauerstoffatomen ein Alkylradikal gebildet und Kohlenstoffdioxid in die Gasphase freigegeben (Gleichung xiv und xv). In der letzten Phase der vorrangig stattfindenden Oxidationsreaktionen durch freie Radikale der Gasphase werden Polymeralkyl- und Polymercarbonylradikale durch Reaktionen mit atomaren Sauerstoff und Hydroxylradikalen zu Alkohole und organische Säuren umgewandelt (Gleichungen xvii und xiv) oder werden durch Wasserstoffanlagerung wieder in den Anfangszustand zurückversetzt (Gleichung xvi). Von den in der Gasphase gebildeten reaktiven Spezies (O_2^* , O_3 , H , N , HO_2 , O und OH) sind der atomare Sauerstoff und OH-Radikale die reaktivsten Spezies.

Viele der in aliphatischen Strukturen stattfindenden Reaktionen müssen bei Polymeren wie Polystyrol auch für den aromatischen Teil betrachtet werden. Hierzu gibt es einige Untersuchungen von Ranby et al. und Murakami et al. [82, 83] die jedoch ohne den Einsatz von Plasma durchgeführt wurden. Die hier beschriebenen Reaktionen sind mit den Beschreibungen von Dorai et al. vergleichbar.

1.5 Plasmadiagnostik

Die Plasmadiagnostik ist ein weites Feld, da Plasmen Gemische der vielfältigsten Spezies sind. Bei Atmosphärendruckplasmen können jedoch nicht alle Diagnostikmöglichkeiten auf Grund des hohen Drucks genutzt werden. So sind zum Beispiel Laserdiagnostiken mit großen technischen und zeitlichen Aufwendungen verbunden. Als eine gute Möglichkeit zur Messung von im Plasma vorliegenden Atomen und Molekülen hat sich die Emissionsspektroskopie hervor getan. Jedoch können hier nur angeregt Spezies detektiert werden.

Ein weiterer Parameter, um Plasmen untereinander besser vergleichen zu können,

ist die Bestimmung der in das Plasma eingebrachten Leistung. Bei dielektrisch behinderten Plasmen kann dies über die Methode der Lissajousfigur erfolgen. Hiermit lassen sich neben der Zyklusenergie auch die Kapazität der Anordnung und des Dielektrikums bestimmen.

1.5.1 Plasmaleistung

Die Plasmaleistung ist die dissipative Energie des Systems und wird zur Erzeugung der geladenen, angeregten und reaktiven Spezies genutzt. Zur Bestimmung der Plasmaleistung sind Kenntnisse über den Äquivalentschaltkreis der Plasmaquelle notwendig. Ein Modell zur Beschreibung von dielektrischen Barriereentladungen am Beispiel der Volumenentladung ist bei Lui und Neiger [84] zu finden.

Die Gesamtkapazität C des Systems setzt sich aus der Gaskapazität C_g und der Kapazität des Dielektrikums C_d zusammen (siehe Abb. 1.9).

$$P_{p,g}(t) = \left(\frac{1}{C_g} + \frac{1}{C_d} \right)^{-1} \quad (1.18)$$

Die Plasmaleistung setzt sich als Produkt der Spannung über dem Gasraum und dem Entladungsstrom der Mikroentladungen $I_{p,g}(t)$ zusammen. Der Entladungsstrom der Mikroentladungen wird dabei als zeit- und spannungsabhängige Stromquelle betrachtet. Über einen Messkondensator der Kapazität C_m wird die Spannung $U_c(t)$ gemessen. Nach Gleichung 1.19 kann der Gesamtstrom $I_{t,a}(t)$ bestimmt werden.

$$I_{t,a}(t) = C_m \frac{d}{dt} \left(U_c(t) \right) \quad (1.19)$$

Aus der Gesamtspannung $U_a(t)$ und dem Gesamtstrom $I_{t,a}(t)$ wird nach Gleichung 1.20 die Gesamtleistung, welche in das System hinein fließt, bestimmt.

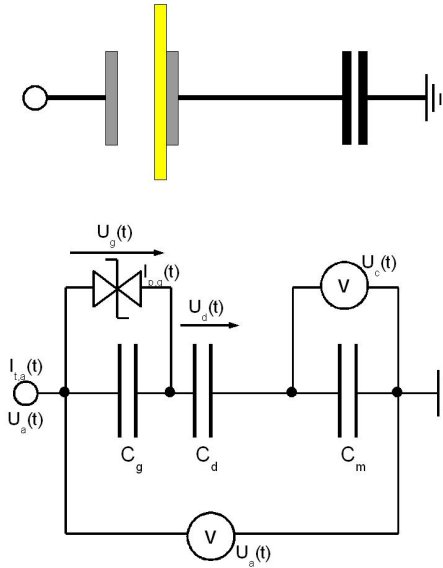


Abbildung 1.9: oben: einseitig behinderte dielektrische Volumenentladung mit Messkondensator; unten: Ersatzschaltbild und zugehörige Ströme und Spannungen

C_g - Gaskapazität, C_d - Kapazität des Dielektrikums, C_m - Messkapazität, $U_a(t)$ - Gesamtspannung, $I_{t,a}(t)$ - Gesamtstrom, $I_{p,g}(t)$ - Entladungsstrom, $U_c(t)$ - Spannung über Messkondensator, $U_g(t)$ - Spannung über Entladungsraum, $U_d(t)$ - Spannung über Dielektrikum

$$P_{t,a}(t) = U_a(t) \cdot I_{t,a}(t) = \left(U_d(t) + U_g(t) \right) \cdot \left(I_{p,g}(t) + I_{v,g}(t) \right) \quad (1.20)$$

Ist die verwendete Hochspannung eine sinusförmige Wechselspannung, so kann zur Bestimmung der Plasmaleistung das von Manley [86] beschriebene Verfahren der Lissajousfigur verwendet werden. Hierbei werden die Spannungen $U_a(t)$ und $U_c(t)$ in einer X-Y-Darstellung aufgetragen. Multipliziert man die Spannung über dem Messkondensator $U_c(t)$ mit dessen Kapazität C_m , so erhält man die auf dem Kondensator befindliche Ladung Q . Die Zyklusenergie ist die von der Kurve eingeschlossene Fläche. In den Bereichen 2-3 und 4-1 findet die Entladung statt (Abbildung 1.10). Aus der Steigung dieser Kurvenabschnitte lässt sich die Dielektrikumskapazität C_d ermitteln. Die Steigungen der Bereiche 1-2 und 3-4,

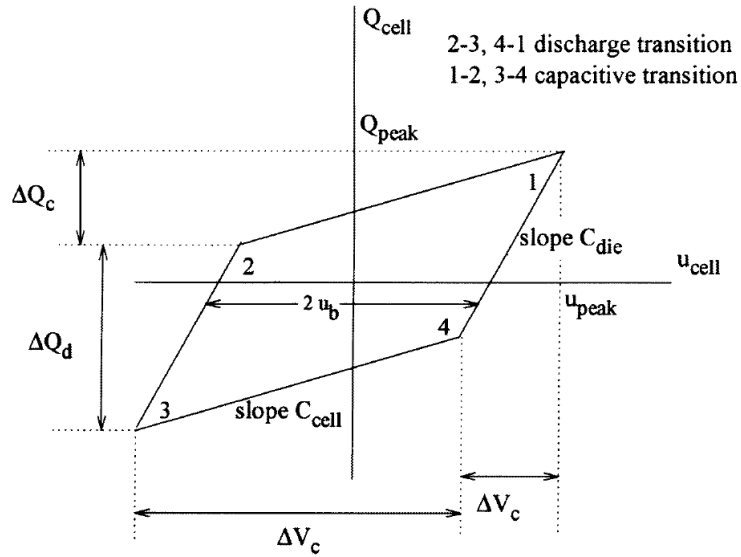


Abbildung 1.10: Lissajousfigur mit Kennzeichnung der Kenngrößen der Elektrodenanordnung aus [85]; $C_{die} = C_d$, $C_{cell} = C_g$

in denen die Kapazitäten ohne Plasma umgeladen werden, kann die Gesamtkapazität C_g bestimmt werden. Die Größen U_{peak} und Q_{peak} geben Auskunft über die Amplitude der Hochspannung und die maximal transferierte Ladung.

1.5.2 Optische Emissionsspektroskopie

Eine nichtinvasive Methode zur Plasmadiagnostik ist die optische Emissionsspektroskopie (OES). Neben geladenen und chemisch aktiven Spezies entstehen im Plasma auch angeregte Zustände. Die Abregung dieser Zustände erfolgt unter anderem durch spontane Emission. Aus dieser Art von spektroskopischem Fingerabdruck können Aussagen über die Zusammensetzung des Plasmas gewonnen werden. Mittels der OES können wellenlängenabhängig die Intensitäten der Strahlungsübergänge detektiert werden. Die Linienintensität $I_{ij} = k_{optisch} A_{ij} N_i$ wird durch die optischen Gegebenheiten des Versuchsaufbaus der Anzahl der Atome im Zustand i und dem Einsteinkoeffizienten der spontanen Emission A_{ij} bestimmt. Damit induzierte Emission und Absorption entlang des Lichtweges vernachlässigt werden können, muss das Plasma optisch dünn sein. Aus Messun-

gen der mittleren Lebensdauer des Zustandes E_i erhält man die Summe der Einsteinkoeffizienten $A_i = \sum A_{ij}$. Die mittlere Lebensdauer τ_i des Zustandes E_i ist nun $\tau_i = \frac{1}{A_i}$. Treten neben der natürlichen Lebensdauer noch weitere Abregungsmechanismen wie Quenchingprozesse durch inelastische Stöße auf, so ergibt sich eine effektive Lebensdauer $\tau_i^{eff} = \frac{1}{A_i + R_i}$, mit R_i als stoßinduzierte Entvölkerungswahrscheinlichkeit. In der Literatur werden vereinfachte Modelle angegeben, mit denen unter besonderen Annahmen, aus den Emissionsspektren, Rückschlüsse auf quantitative Zusammenhänge von Plasmaspezies gemacht werden können.

In $N_2/O_2/H_2O$ Gasgemischen wird in Plasmaentladungen eine Vielzahl von reaktiven Spezies, wie elektronisch und vibrational angeregte Moleküle ($N - 2$, O_2 , NO), atomare und molekulare positive Ionen (N^+ , N_2^+ , N_3^+ , N_4^+ , O^+ , O_2^+ , NO^+), elektronisch angeregt oder im Grundzustand befindliche atomare Spezies (N und O) und negative Ionen (O^- , O_2^- , O_3^- , O_4^-) [87] erzeugt. Während einige Spezies durch Elektronenstoßprozesse bei der Streamerbildung und -ausbreitung entstehen, werden andere transiente und stabile Entladungsprodukte durch Rekombination, Ladungstransfer, Elektronenanlagerung, Energietransferprozesse und chemische Reaktionen gebildet. Untersuchungen in N_2/O_2 Entladungen zeigen die besondere Bedeutung der unteren Vibrationszustände ($\nu < 15$) $N_2(X^1 \sum^+, \nu)$, metastabiler $N_2(A^3 \sum_u^+)$ sowie atomarer Spezies. Die metastabilen Spezies sind eine grundlegende Energiequelle für Emissionen von OH, NO, NH und N_2 im ultravioletten und sichtbaren Spektrum. Elektronen mit Energien im Bereich von 1 – 5 eV können sehr effizient die unteren Vibrationszustände $N_2(X^1 \sum^+, \nu < 15)$ durch Elektron-Vibration (e-V) Energieaustauschprozesse anregen. Diese Energie kann dann durch Stöße der schweren Teilchen in Form von Vibration-Vibration (V-V) und Vibration-Translation (V-T) Prozesse ausgetauscht werden. Die Anhebung der Population der angeregten Grundzustände senkt die Schwellwertenergie für die Elektronenstoßanregung, Dissoziations- und Ionisationsprozesse. V-T und V-V Austauschprozesse bestimmen die Streamer-Relaxationsphase.

Metastabile $N_2(A^3 \sum_u^+)$ Spezies sind in der Lage molekularen Sauerstoff zu dissoziieren. Über Reaktionen mit metastabilen singulett Spezies $N_2(a'^1 \sum_u^-)$ sind sie auch in der Lage, freie Elektronen zu bilden, was Auswirkungen auf das Zündverhalten der Entladung hat. Über resonante Energietransfers können di-

atomare Spezies wie NO und OH (z.B. $N_2(A^3 \sum_u^+) + OH \rightarrow N_2 + OH^*$) angeregt werden. Energie-Pooling Prozesse können zur Bevölkung von höheren elektronischen N_2 Zuständen ($B^3\Pi_g$, $C^3\Pi_u$, $C''^5\Pi_u$ und $C'^3\Pi_u$) führen.

Emissionen von NO_γ Linien sind in N_2/O_2 Entladungen nur bei geringen Sauerstoffkonzentrationen kleiner 1000 ppm zu beobachten.

1.6 Oberflächendiagnostik

Wechselwirken Plasmen mit organischen Materialien wie Polymeren oder Bakterien, so rufen sie an deren Oberflächen chemische Veränderungen hervor. Chemische Veränderungen der Oberflächen, von zum Beispiel Polystyrol, welches sehr häufig für Diagnostikartikel in biologischen und medizinischen Bereichen eingesetzt wird, lassen sich mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie und Kontaktwinkelmessungen bestimmen. Diese Untersuchungen können direkt nach der Plasmabehandlungen durchgeführt werden. Mittels der Rasterkraftmikroskopie erhält man topographische Informationen der Oberflächen, mit Auflösungen im Bereich von wenigen Nanometern.

1.6.1 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Mittels der Infrarot (IR)-Spektroskopie erhält man Informationen über die molekularen Vibrationen eines Stoffes. Die Vibrationsanregung der Moleküle erfolgt durch Bestrahlung des Stoffes mit einer breitbandigen IR-Quelle bis in Tiefen von $10\ \mu\text{m}$. Aus den so gemessenen Spektren kann die Absorption A bei einer bestimmten Wellenzahl ν aus der in den Stoff eindringenden Intensität I_0 und der transmittierten Strahlung I nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt werden (Gl. 1.21).

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (1.21)$$

Die Absorption wird durch das Absorptionsvermögen des Stoffes, die Zelldicke und die Stoffkonzentration bestimmt.

Ein vollständiges IR-Spektrum des nativen Polystyrols ist in der 'Spectral databa-

Tabelle 1.4: Übersicht der Banden im FTIR Spektrum von Polystyrol

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Art der Schwingung
>3000	aromatische C-H Valenzschwingungen
~2900	aliphatische C-H Valenzschwingungen
2000 - 1650	Summation aromatischer C-H Wackel-Schwingungen
1625-1460	C=C Ring-Deformationsschwingungen
<1200	aromatische C-H Deformationsschwingungen
3500-3200	O-H Streckschwingungen
1310-1210	C-O-C Streckschwingungen aromatische Ether
1050-1010	
1140-1085	aliphatische Ether
1900-1550	antisymmetrische C=O Streckschwingungen

se for organic compounds' (kurz SDBS) [88] für den Bereich von 4000 cm⁻¹ bis 400 cm⁻¹ zusammen mit den genauen Lagen der Absorptionspeaks verzeichnet. Das Spektrum von nativen Polystyrol lässt sich in fünf größere Bereiche unterteilen 1.4 [89].

Im Bereich oberhalb von 3000 cm⁻¹ befinden sich C-H Valenzschwingungen des aromatischen Teils. Valenzschwingungen sind Schwingungen entlang der Bindungsachsen bei konstantem Bindungswinkel. Unterhalb von 1200 cm⁻¹ sind aromatische C-H Deformationsschwingungen zu finden. Bei Deformationsschwingungen ändert sich der Bindungswinkel. Weitere durch den aromatischen Teil des Polystyrols hervorgerufene Banden befinden sich im Bereich von 2000 cm⁻¹ bis 1650 cm⁻¹ und werden durch C-H Wackelschwingungen hervorgerufen. Hierbei schwingen die Wasserstoffatome senkrecht zur Ringebene. Entsprechend der Anzahl der Substituenten ergeben sich unterschiedliche Moden. Durch die Summation je zwei dieser Moden ergeben sich charakteristische Bilder für den Bereich von 2000 cm⁻¹ bis 1650 cm⁻¹. Weiterhin treten C=C Ring-Deformationsschwingungen im Bereich von 1625 cm⁻¹ bis 1460 cm⁻¹ auf.

Durch die Plasmabehandlung erfahren die Polymeroberflächen einen Funktionalisierungsprozess. Hierbei können verschiedene Sauerstoff enthaltene polare Gruppen wie Peroxid-, Hydroperoxid-, Hydroxyl-, Carbonyl-, Carboxyl-, Ether- und Estergruppen auf den Oberflächen gebunden werden [90]. Die Reaktionen und

Spezies die zur Bildung dieser chemischen Gruppen führen sind eingehender im Kapitel 1.4.2 beschrieben.

Die O-H Streckschwingungen im Bereich von 3500 cm^{-1} bis 3200 cm^{-1} treten in vielen Polymerspektren als charakteristische Banden auf Grund von Modifikationen oder Alterungsprozessen auf und können von Hydroxyl-, Hydroperoxid- und Carboxylgruppen herrühren. Die antisymmetrischen $C-O-C$ Streckschwingungen aromatischer Ether besitzen IR Absorptionsbanden für die Aryl-O Bindung im Bereich von 1310 cm^{-1} bis 1210 cm^{-1} und für die $O-CH_2$ oder $O-CH_3$ Bindungen zwischen 1050 cm^{-1} bis 1010 cm^{-1} . Banden aliphatische Ether sind hingegen zwischen 1140 cm^{-1} bis 1085 cm^{-1} zu finden. $C=O$ Bindungen lassen sich im IR sehr leicht schon in geringen Stoffkonzentrationen detektieren. Die IR aktiven antisymmetrischen $C=O$ Streckschwingungen der meisten Carbonylverbindungen haben Banden im Bereich von 1900 cm^{-1} bis 1550 cm^{-1} . C-C und O-O Bindungen lassen sich nur schwer und unter bestimmten Umständen detektieren. Sehr ausführliche und weiterführende Interpretationen von IR Absorptionsbanden sind in Lin-Vien [89] und in Sokrates [91] verzeichnet.

1.6.2 Kontaktwinkel

Für Zellkulturversuche sind die Wechelswirkungen zwischen Zellen und den Oberflächen, auf denen sie sich befinden von Bedeutung. Nur wenn die Oberfläche eine bestimmte Oberflächenenergie aufweist, können Zellen an ihr atherieren.

Im Inneren eines Festkörpers ist jedes Molekül von anderen Molekülen umgeben und kann mit diesen wechselwirken. Moleküle, die sich an der Oberfläche befinden, werden durch Nachbarmoleküle in Richtung des Inneren des Festkörpers gezogen. Hierdurch wird eine Oberflächenspannung aufgebaut. Die Moleküle an der Oberfläche befinden sich so in einem höheren energetischen Zustand als Moleküle im Inneren. Diese Oberflächenenergie kann als die Energie verstanden werden, die zur Vergrößerung der Oberfläche notwendig wäre.

Die Oberflächenenergie von Festkörpern kann in der Regel nicht direkt bestimmt werden und erfolgt aus diesem Grund über das Benetzungsverhalten verschiedener definierter Flüssigkeiten. Bei dieser Methode wechselwirken die Moleküle der

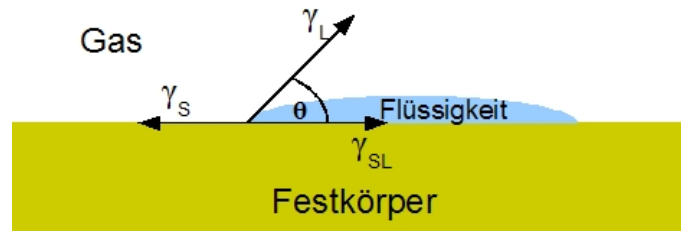


Abbildung 1.11: Verhältnisse für Flüssigkeitstropfen auf Oberfläche: γ_L Oberflächenenergie der Flüssigkeit, γ_S Oberflächenenergie des Festkörpers, γ_{SL} Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und Festkörper, θ Kontaktwinkel (Randwinkel) am Triplepunkt

Flüssigkeit mit der obersten Molekülschicht des Festkörpers. Am Rand eines auf einer Oberfläche abgesetzten Tropfens gibt es einen Triplepunkt, an dem Flüssigkeit (L), Gas (G) und Festkörper (S) aufeinander treffen (Abb. 1.11). Dabei wird die Form des Tropfens durch die Wechselwirkungen der drei Phasen bestimmt. Das System strebt hierbei nach einem minimalen Energieinhalt. Dieser Sachverhalt wird durch die Young'sche Gleichung 1.22 [92] beschrieben.

$$\gamma_L \cdot \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL} - \pi_e \quad (1.22)$$

Der Kontaktwinkel θ am Triplepunkt für eine Flüssigkeit mit der Oberflächenenergie γ_L wird durch die Grenzflächenenergie γ_{SL} und der Oberflächenenergie γ_S des Festkörpers bestimmt. Die Grenzflächenenergie kann dabei als Energie verstanden werden, die notwendig ist um Flüssigkeit und Festkörper voneinander zu trennen. Der Parameter π_e kann im Folgenden als 0 betrachtet werden, da eine hochenergetische Flüssigkeit nicht die Oberflächenenergie eines niedrigerenergetischen Materials reduzieren kann [92].

Die Grenzflächenenergie wird durch Dispersionswechselwirkungen, polare Wechselwirkungen und durch über Wasserstoffbrücken wechselwirkende Moleküle zwischen den verschiedenen Phasen bestimmt. Moleküle ohne ein permanentes Dipolmoment weisen Dispersionswechselwirkungen auf, wohin gegen Moleküle, von denen mindestens eines ein Dipolmoment besitzt, über pola-

re Wechselwirkungen interagieren. Über Wasserstoffbrücken interagierende Moleküle werden separat betrachtet.

In der 'Extended Fowkes' [93] Methode setzt sich die Wechselwirkung aus rein dispersiven (unpolare Bindungen), rein polaren und reinen Wasserstoffbrückenbindungskomponenten (O-H und N-H Bindungen) zusammen (Gleichung 1.23).

$$\gamma_{S/L} = \gamma_{S/L}^D + \gamma_{S/L}^P + \gamma_{S/L}^H \quad (1.23)$$

Unter Anwendung des geometrischen Mittels erhält man die Grenzflächenspannung γ_{SL} 1.24.

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2 \left(\sqrt{\gamma_S^D + \gamma_L^D} + \sqrt{\gamma_S^P + \gamma_L^P} + \sqrt{\gamma_S^H + \gamma_L^H} \right) \quad (1.24)$$

Setzt man Gleichung 1.24 in die Young'sche Gleichung ein, so erhält man folgenden Ausdruck:

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^D + \gamma_L^D} + \sqrt{\gamma_S^P + \gamma_L^P} + \sqrt{\gamma_S^H + \gamma_L^H} \right) \quad (1.25)$$

Unter Verwendung von drei Flüssigkeiten mit bekannten Oberflächenspannungen ergibt sich aus Gleichung 1.25 ein Gleichungssystem mit dem es möglich ist, die Oberflächenenergie γ_S und deren Einzelkomponenten γ_S^D , γ_S^P und γ_S^H zu berechnen.

1.6.3 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscope*) (AFM) wurde 1986 von Binnig und Quate entwickelt. Damit können je nach Betriebsmodus auf mechanischem Weg Oberflächen abgetastet oder atomare Kräfte bestimmt werden. Die Rasterkraftmikroskopie ist eine moderne Methode zur Erfassung von Oberflächentopographien und -eigenschaften im Nanometerbereich.

Das Messprinzip beruht auf der Messung der Auslenkung eines Federbalkens. Die Auslenkung des Federbalkens, an dem sich die Messspitze befindet, wird durch optische Sensoren erfasst. In Abhängigkeit von der Probenbeschaffenheit und der Messspitze, die typischer Weise einen Spitzenradius von 10 nm besitzt, sind laterale Auflösungen von wenigen Nanometern bis hin zu einzelnen Atomen möglich. Während der Messung rastert die Messspitze in Zeilen oder Spalten, getrieben von Piezoelementen, über die Probe. Dabei wird punktweise die Auslenkung des Federbalkens gemessen und in eine Höhen- oder Materialinformation umgerechnet. Es werden drei verschiedene Messmodi unterschieden. Im Kontaktmodus steht die Messspitze im direkten mechanischen Kontakt mit der Probenoberfläche, während der Nicht-Kontakt und intermittierende Modus zu den dynamischen Anregungsmodi gehören. Im Nicht-Kontakt Modus wird der Federbalken zu einer Schwingung, meist in Resonanz, angeregt. Durch Wechselwirkung der Messspitze mit der Probenoberfläche werden die Resonanzfrequenz oder die Phase zwischen Anregung und Schwingung des Federbalkens verschoben. Im intermittierenden Modus wird der Federbalken nahe der Resonanzfrequenz angeregt. Auch hier kommt es wie im Nicht-Kontaktmodus durch Wechselwirkung der Messspitze und Probenoberfläche zu einer Veränderung der Resonanzfrequenz. Die damit veränderte Amplitude des Federbalkens wird durch Variation des Abstandes zur Probe durch einen Regelkreis konstant gehalten.

Durch Ausnutzen bestimmter physikalischer und chemischer Prinzipien lassen sich auch magnetische, elektrische, mechanische und chemische Eigenschaften bestimmen. Zudem lassen sich Verformungseigenschaften durch Kraft-Abstandskurven messen. Durch chemische Modifikationen der Messspitze können so Bindungskräfte zwischen einzelnen Molekülen bestimmt werden.

1.7 Biologie der Zelle

Die kleinste lebende Einheit, aus denen alle Lebewesen bestehen, ist die Zelle. Sie treten sowohl in einzelligen eigenständigen Organismen, als auch in Geweben und Organen vielzelliger Organismen auf [94]. Zellen können unterschiedlich hoch spezialisierte Funktionen besitzen und unterschiedlichen Bedingungen angepasst sein. Die Gesamtheit der Organismen lässt sich in drei große Gruppen einteilen:

Bacteria, Archea und Eukarya, die trotz einiger Unterschiede in den Grundzügen ihrer Organisation überein stimmen.

Der Innenraum der Zellen ist mit einer wässrigen Lösung gefüllt, die in hohen Konzentrationen Proteine, Proteinkomplexe, Makromoleküle und niedermolekulare Verbindungen enthält. Dieser hochviskose Innenraum wird auch als Cytoplasma bezeichnet und ist Reaktionsraum für eine große Anzahl an Stoffwechselreaktionen und regulatorischen Vorgängen. Begrenzt wird das Cytoplasma, welches außerdem in großen Mengen Ribosome und Reservesubstanzen enthält, durch die Cytoplasmamembran. Diese Membran, ist in der Regel eine wenige Nanometer dicke Lipiddoppelschicht, die vorrangig aus Phospholipiden besteht und für die meisten hydrophilen Moleküle undurchlässig ist. In der Cytoplasmamembran sind Proteinmoleküle enthalten, die den Transport- und Informationsaustausch der Zellen gewährleisten.

Tierische Zellen sind von einer von ihnen sezernierten extrazellulären Matrix umgeben. Bei Pflanzen, Pilzen und Bakterien wird dies als Zellwand bezeichnet. Pflanzen, Pilze und Tiere gehören zu den Eukaryoten, da sie einen echten Zellkern besitzen. Dieser Kern ist von einer Kernhülle umgeben und enthält die Desoxy-Ribonukleinsäure (DNA). Bacteria und Archea gehören zu den Prokaryoten und besitzen keinen echten Zellkern. Bei ihnen liegt die DNA zwar in einer kernähnlichen Struktur vor, jedoch ist diese nicht von einer Kernmembran umhüllt. Fast dreiviertel der irdischen Biomasse besteht aus Prokaryoten [94]. Eukaryotische Zellen sind deutlich größer als prokaryotische Zellen und besitzen ein mehr als 40-faches Volumen. Durch die Kleinheit der prokaryotischen Zellen wird deren Oberfläche gegenüber dem Volumen stark vergrößert, was sich in einem starken Stoffaustausch mit dem umgebenden Milieu zeigt. Während Prokaryoten für die Zellteilung in der Regel weniger als eine Stunde benötigen, brauchen Eukaryoten hierfür mehr als einen Tag.

1.7.1 Bacteria

Die Gruppe der Bacteria wird entsprechend des Zellwandaufbaus in grampositive und gramnegative Bakterien unterteilt. Bei grampositiven Bakterien ist die Cytoplasmamembran von einer dicken Peptidoglykanschicht, die auch als Murein-

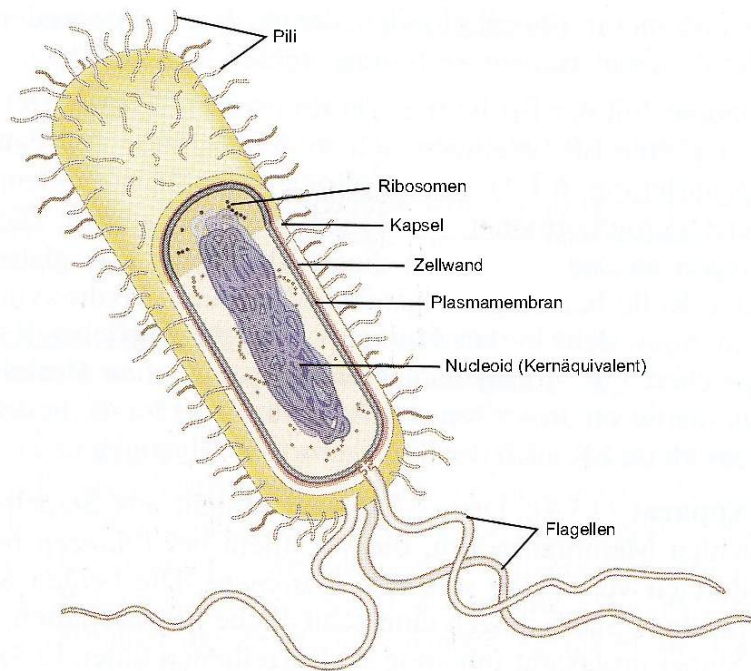


Abbildung 1.12: Allgemeine Struktur einer Bakterienzelle aus [95]

schicht bezeichnet wird, umgeben. Gramnegative Bakterien haben eine dünnere Peptidoglykanschicht als die grampositiven Bakterien, besitzen aber zusätzlich eine äußere Membran aus Lipopolysacchariden und Phospholipiden. Die DNA der Bacteria befindet sich im Nukleoid, einer bestimmten Region des Cytoplasmas (Abbildung 1.12). Einige Bacteria besitzen zur Fortbewegung eine oder mehrere Flagellen. Neben den Flagellen sind die Fimbrien weitere extrazelluläre Zellanhänge. Diese dienen zur Anheftung an Oberflächen oder andere Zellen [94].

Eine kleine Gruppe der Bacteria besitzt die Möglichkeit, Sporen auszubilden. Sporen stellen eine Überdauerungsform dar und sind sehr resistent gegenüber äußeren Einflüssen wie Hitze, Kälte, Trockenheit, Strahlung und chemische Agenzien [16, 25, 96, 97]. Aus diesem Grund werden Sporen auch zur Beurteilung von Sterilisationsverfahren eingesetzt (z.B. DIN EN ISO 11138- 1 bis 5). Die Sporulation wird durch, für die vegetativen Formen, ungünstige Umweltbedingungen ausgelöst.

Einen der am besten untersuchten Mikroorganismen stellt der *Bacillus atrophaeus* dar. Die Sporen von *Bac. atrophaeus* werden von einem inneren lamellenartigen und ca. 75 nm breiten Mantel und einem äußeren bis zu 200 nm breiten Mantel umgeben [98]. Es wird vermutet, dass der innere Mantel vorrangig aus Proteinen besteht. Diese beiden Schichten schützen den, von einer inneren Membran umgebenen, Kern der Spore [99]. Auch wenn der Kern einen Wassergehalt von 30 - 50% aufweist, so ist er dennoch als dehydriert anzusehen. Der den Kern umgebene Cortex nimmt eine besondere Stellung zur Aufrechterhaltung der Dehydrierung ein. Die vorrangig im Mantel befindliche dipicolinische Säure, die bezogen auf das Trockengewicht 8-17% ausmacht [100, 101], hat einen bedeutenden Einfluss auf die Hitzeresistenz. Sie ist, wie der niedrige Wassergehalt, von der Temperatur und dem Nährstoffangebot während der Sporulation abhängig [100, 102, 103]. Neben den Proteinen, Wasser und der dipicolinischen Säure gehören in größerem Maße auch Kalzium, Magnesium und Stickstoff zu den chemischen Bestandteilen der Spore [100–102, 104–106].

Der Nachweis von Bakterien erfolgt über deren Vermehrung auf Agarplatten oder in Bouillion. Über Verdünnungsreihen sind auch quantitative Aussagen über die koloniebildenden Einheiten auf einem Objekt oder in einer Substanz möglich (siehe Kapitel B.5).

1.7.2 Eukarya

Eukaryotische Zellen sind komplexer in ihrer Organisation als prokaryontische Zellen. Zudem zeigen sie eine größere Vielfalt. Es werden im tierischen Organismus vier verschiedene Arten von Gewebe unterschieden (Ephitelien, Binde- und Stützgewebe, Muskelgewebe, Nervengewebe) [94], die aber in den wesentlichen Zügen ihrer Organisation übereinstimmen. In der eukaryotischen Zelle ist das Cytoplasma in membranumhüllte Kompartimente unterteilt, in denen Stoffwechselprozesse unabhängig von einander ablaufen. Bis auf die Mitochondrien und Plastiden können alle Kompartimente ständig Substanzen über Transportvesikel untereinander, mit anderen Zellen, als auch mit ihrer Umgebung, austauschen. Der Zellkern, welcher den größten Teil der DNA enthält, ist von einer Doppelmembran

(Kernhülle) umgeben. Detaillierte Beschreibungen der einzelnen Kompartimente und deren Funktionen und Interaktionen sind in zahlreichen Lehrbüchern der Biologie zu finden (Abbildung 1.13).

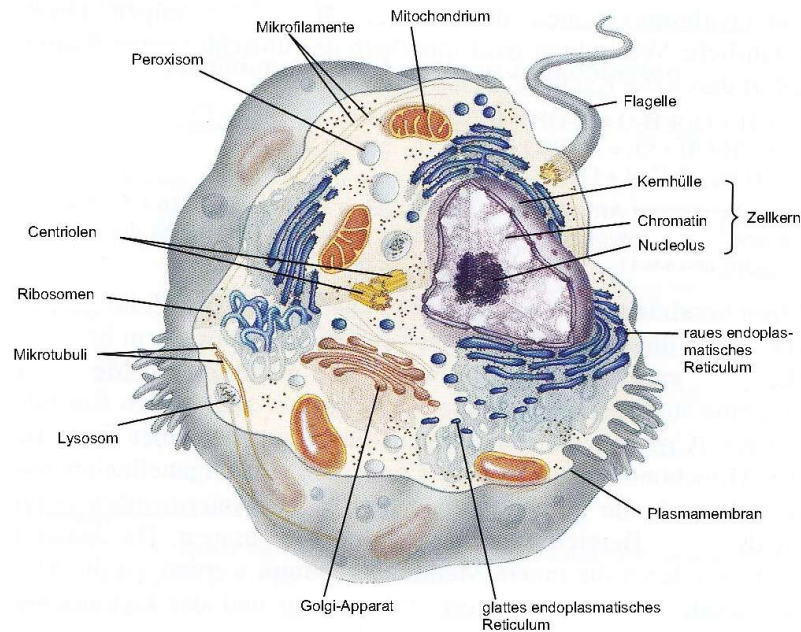


Abbildung 1.13: Allgemeine Struktur einer eukaryotischen Zelle aus [95]

Um die in Organismen ablaufenden Prozesse auf zellulärer Ebene besser verstehen zu können, wurden einzelne Zelllinien kultiviert und charakterisiert. Einsatzmöglichkeiten von Zellkulturen sind zum Beispiel [107] die Analyse von intrazellulären Parametern, intrazellulären Transportwegen, Signalwegen, die Aufklärung von Infektionsmechanismen, die Induktion von Differenzierungsvorgängen, toxikologische Untersuchungen und das Studium der Zell-Zell-Wechselwirkung. Sie können auch als Ersatz für Tierversuche dienen.

Zellkulturen werden nach ihren Eigenschaften unterschieden. Ein Unterscheidungsmerkmal ist die Art des Wachstums. Einige Zellen wachsen adhärent, während andere sich in Suspensionen kultivieren lassen. Wichtiger ist aber das Merkmal, ob eine Zellkultur nur zeitlich begrenzt oder dauerhaft kultiviert werden kann. Zeitlich begrenzt wachsende Primärzellkulturen bieten den Vorteil, dass

sie in-vitro auch die meisten ihrer in-vivo Eigenschaften beibehalten, was sie realitätsnäher als Permanentkulturen macht. Permanente Zellkulturen zeigen meistens veränderte Eigenschaften und auch Morphologien gegenüber ihren normalen Zellen, von denen sie abstammen. Ihre Unsterblichkeit erreichen sie durch eine genetisch in-vitro hervorgerufene Veränderung. Eine solche Veränderung tritt bei Tumorzellen in-vivo auf. Einige der bekanntesten Zelllinien sind zum Beispiel die HaCaT, CHO, HEK und die HeLa. Die HeLa Zelllinie war die erste epithelähnliche, vom Menschen stammende Zelllinie.

Die Eigenschaften der Zellen und deren Verhalten unter bestimmten äußeren Einflüssen lassen sich mit Mikroskopieverfahren wie Hellfeld, Phasenkontrast, Konfokal und Differential-Interferenz-Kontrast an Einzelzellen oder kleineren Zellgruppen studieren. Um nur bestimmte Bereiche in den Zellen oder in der extrazellulären Matrix sichtbar zu machen, können auch fluoreszierende Stoffe eingesetzt werden. Diese Moleküle absorbieren kurzwellige Strahlung und strahlen längerwelliges, sichtbares Licht ab. Einige Zellbestandteile besitzen auch eine natürliche Fluoreszenz. Viele Eigenschaften von Zellkulturen und deren Verhalten auf externe Einflüsse (z.B. Vitalität, Zytotoxizität, Apoptose oder Proliferation) können mit diversen Assays untersucht werden. Der Nachweis erfolgt oftmals durch Farbreaktionen der Zellen oder durch in das Zellkulturmedium abgegebene Farbstoffe, welche photometrisch erfasst werden. Einer der am häufigsten verwendeten Tests ist der XTT Test, welcher eine Weiterentwicklung des MTT Test ist. Er dient zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen. Nur in lebenden vitalen Zellen können die im Mitochondrium lokalisierten Dehydrogenasen XTT unter Anwesenheit von PMS reduzieren und als Reaktionsprodukt ein farbiges Formazan bilden [107]. Detailliertere Angaben zu diesem Protokoll sind in Kapitel B.6 zu finden.

Kapitel 2

Ergebnisse und Diskussion

2.1 Plasmaparameter

Zyklusenergie und Plasmaleistung

Ein geeigneter Parameter um Plasmaquellen zu vergleichen ist die Plasmaleistung. Aus dem Produkt der Zyklusenergie, der Anregungsfrequenz und dem verwendeten Pulsmuster erhält man die mittlere in das Plasma eingebrachte Leistung. Die Zyklusenergie sowie die Gesamt- und Dielektrikumskapazität wurden wie in Kapitel 1.5.1 und B.3.3 beschrieben ermittelt.

Die Zyklusenergie in Abhängigkeit von der an die Anordnung angelegten Hochspannung ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Für den untersuchten Bereich ist deutlich das nichtlineare Ansteigen der Zyklusenergie zu erkennen, was mit dem in Kapitel 1.3.1 vorgestellten Modell (siehe Gleichung 1.10) überein stimmt. Bei der in den folgenden Untersuchungen am häufigsten verwendeten Spannung von $24\text{ kV}_{\text{Spitze-Spitze}}$ beträgt die Energie pro Periode $5,5\text{ mJ}$. Unter Berücksichtigung der Elektrodenfläche ergibt sich eine mittlere Leistungsdichte von rund $180\frac{\text{mW}}{\text{kHz}\cdot\text{cm}^2}$. Zur Bestimmung der absoluten Plasmaleistung müssen jedoch mögliche Pulsmuster berücksichtigt werden. Für die in Kapitel B.2 beschriebenen Impulsspannungsquelle und eine alternierenden Pulsfrequenz von 2 kHz mit 25 % Plasma An-Zeit beträgt die Plasmaleistung rund $1,4\text{ W}$.

Aus der Lissajousfigur (siehe Abbildung C.1 im Anhang) lässt sich die Gesamt-

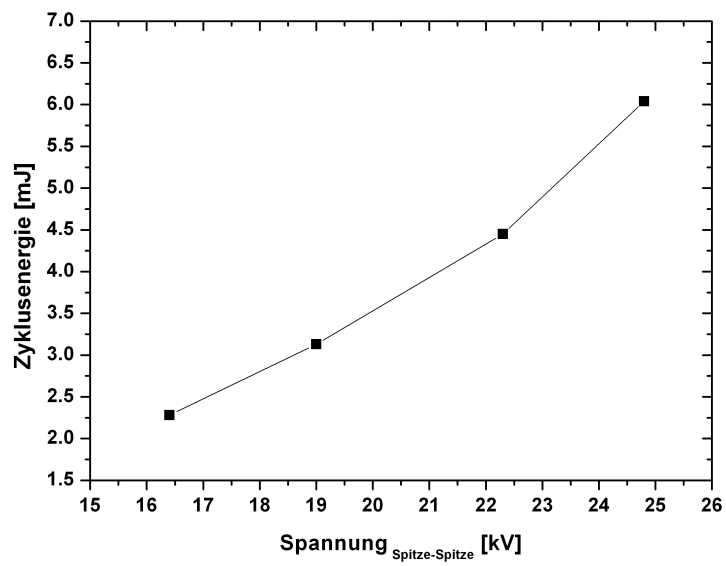


Abbildung 2.1: Zyklusenergie der zweidimensionalen Oberflächenentladung in Abhängigkeit von der Hochspannung bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 20 %

kapazität des Systems zu 43 pF und die Kapazität des Dielektrikums zu 77 pF ermitteln. In Hähnel et al. [4] wurde für identische Bedingungen beschrieben, dass die Zyklusenergie für den untersuchten Frequenzbereich von der relativen Luftfeuchtigkeit unabhängig ist.

Optische Emissionsspektroskopie

Wie in Kapitel 1.2.1 dargelegt, hat die vom Plasma ausgesandte ultraviolette Strahlung einen entscheidenden Einfluss auf die antimikrobielle Wirksamkeit. Daraus resultierend wurde als weitere Methode zur Charakterisierung des Plasmas, die optische Emissionsspektroskopie angewandt. In Abbildung 2.2 sind vergleichend die Spektren von Luft bei 0 % und 70 % relativer Luftfeuchtigkeit sowie von trockenem Stickstoff für den Bereich von 250 nm bis 500 nm dargestellt.

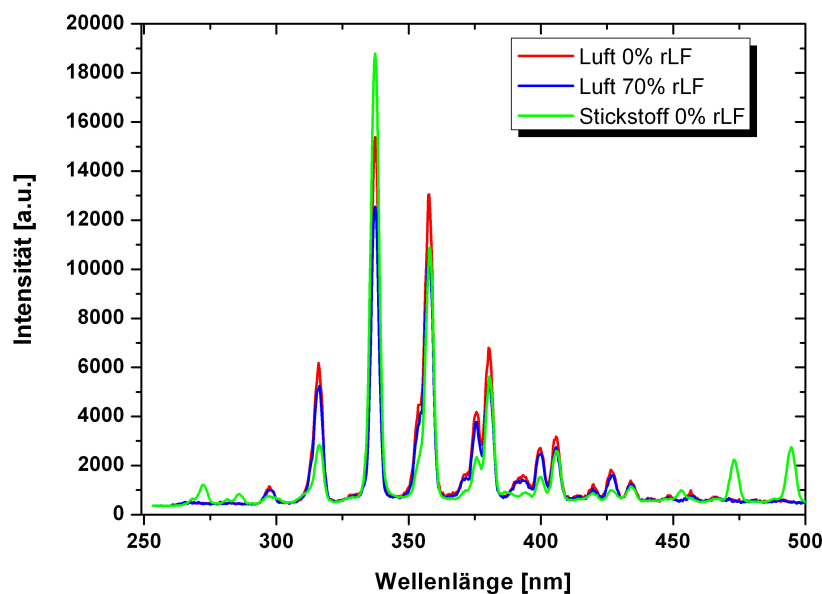


Abbildung 2.2: *Emissionsspektren einer dielektrisch behinderten Oberflächenentladung in Luft bei 0% und 70% relativer Luftfeuchtigkeit im Vergleich zu trockenem Stickstoff*

Die Emissionsspektren von Luft und Stickstoff weisen im UV-A Bereich zwischen

300 und 400 nm vergleichbare Spektrallinien auf. Diese Linien lassen sich dem zweiten positiven System von Stickstoff zuordnen. Für die Emissionsspektren von Luft lässt sich in Abbildung 2.2 eine Abnahme der Emission mit steigender Luftfeuchtigkeit erkennen. Dies ist in Falkenstein et al. [85] mit einer geringeren Zahl an Mikroentladungen und der damit reduzierten Rate an Reaktionen begründet. Trotz dieser Abnahme mit steigender relativer Luftfeuchtigkeit bleibt die Emission hoch. Unterhalb von 290 nm (UV-B, UV-C) gibt es keine signifikante Strahlung. UV-C Strahlung wird von Quecksilberstrahlern ausgesandt und besitzt eine biozide Wirkung.

Für trockenen Stickstoff treten auch unterhalb von 300 nm noch mehrere Banden auf, die dem NO_γ -System zugeordnet werden können. Diese treten, wie in Kapitel 1.5.2 beschrieben, nur bei kleinen Verunreinigungen mit Sauerstoff auf und sind aus diesem Grund nicht in den Spektren von Luft zu finden. Diese Verunreinigungen werden durch die an den Oberflächen des Systems adsorbierte Luft und Feuchtigkeit eingebracht.

Die oftmals in der Literatur beschriebene Emission von angeregten Hydroxylradikalen bei 308 bis 310 nm (z.B. Weltmann et al. [108]) ist in Abbildung 2.2 nicht erkennbar. Gründe hierfür können in der geringen in das Plasma eingebrachten Leistung und dem kleinen Volumen des Plasmas, aus dem die emittierte Strahlung detektiert wurde, liegen.

2.2 Oberflächeneigenschaften und- veränderungen

Alle Veränderungen durch die Plasmabehandlungen werden auf das unbehandelte Polystyrol bezogen. Dazu wurden im ersten Schritt die Oberflächenenergien und die zugehörigen Kontaktwinkel von unbehandeltem Polystyrol bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Aus diesen Werten ist die schlechte Benetzung von Polystyrol mit wasserbasierenden und anderen Flüssigkeiten ersichtlich. Weiterhin wird die Oberflächenenergie vom dispersen Anteil dominiert. Die Standardabweichung der polaren Komponente ist im Vergleich zu den anderen Komponenten sehr groß. Dies liegt in den geringen und untereinander sehr ähnlichen polaren Komponenten der Messflüssigkeiten begründet (siehe Tabelle B.1). Bei den Messungen mit Diiodmethan

Tabelle 2.1: über die Längsachse der Proben gemittelten Kontaktwinkel $\bar{\theta}$ und Oberflächenenergien γ_S und die dazugehörigen Standardabweichungen unbehandelter Proben

Flüssigkeit	Kontaktwinkel	
	$\theta[^\circ]$	$\sigma(\theta)[^\circ]$
Wasser	95,7	0,5
Glycerol	80,7	1,1
Diiodmethan	30,9	1,6

Anteile der Oberflächenenergien		
	$\bar{\gamma}_S[\text{mN/m}]$	$\sigma(\bar{\gamma}_S) [\text{mN/m}]$
dispers	41,4	1,6
polar	6,1	4,4
H-Brückenbindung	0,5	0,1

müssen Reaktionen mit der Polystyroloberfläche berücksichtigt werden, wodurch ebenfalls ein Einfluss auf den Kontaktwinkel zustande kommt.

In Abbildung 2.3 sind die Veränderungen der Wasserkontaktwinkel in Abhängigkeit der Behandlungsdauer bei verschiedenen relativen Luftfeuchten dargestellt. Der Abstand zwischen Dielektrikum und Substrat betrug $600\ \mu\text{m}$, bei einer Amplitude der Hochspannung von $9\ \text{kV}$ und einer An-Zeit von 25%. Für gleiche Ausgangsbedingungen sind die Komponenten der Oberflächenenergie in Abbildung 2.4 abgebildet. Zunächst sollen die Veränderungen und die daraus resultierenden chemischen Reaktionen bei 0% relative Luftfeuchtigkeit betrachtet werden. In den ersten 30 s ist eine deutliche Abnahme des Wasserkontaktwinkels zu erkennen. Weiterhin gibt es im Rahmen der Messfehler keine erkennbare Veränderung für den Wasserstoffbrückenbindungsanteil. Die polare Komponente nimmt von $6,1\ \text{mN/m}$ auf $17,6\ \text{mN/m}$ zu, wohin gegen der disperse Anteil von $41,4\ \text{mN/m}$ auf $39,4\ \text{mN/m}$ nur leicht sinkt. Die Standardabweichungen der Werte aus Abbildung 2.4 sind im Anhang in Tabelle C.1 aufgeführt. Hier sind große und stark schwankende Standardabweichungen ($19,3\ \text{Nm/m}$ bis $96,2\ \text{Nm/m}$) für die polare Komponente zu erkennen. Dies liegt an der geringen Differenzen der polaren Komponenten der Messflüssigkeiten (siehe B.1). Aus diesem Grund sollte der Verlauf der polaren Komponente der Oberflächenenergie

als Trend betrachtet werden. Die anderen Bindungskomponenten zeigen deutlich kleine Standardabweichungen im Verhältnis zum Mittelwert.

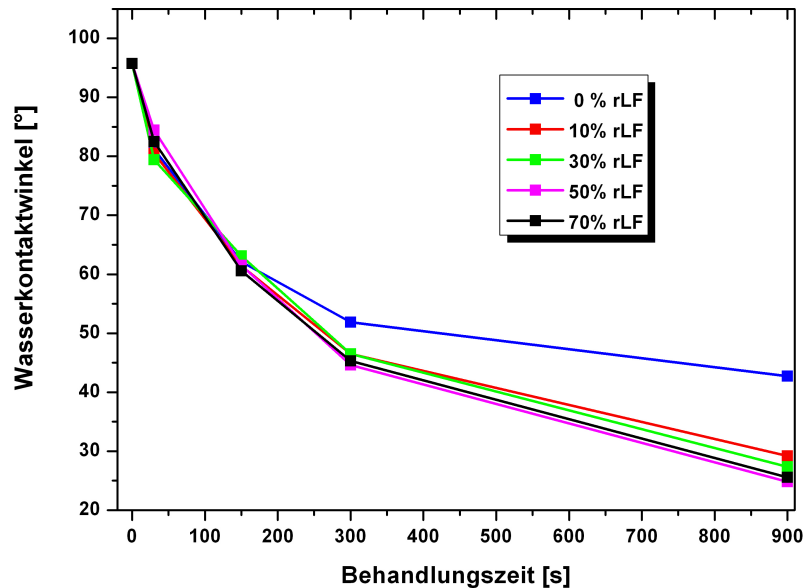


Abbildung 2.3: Wasserkontaktwinkel von Polystyrol in Abhängigkeit von der Behandlungszeit in trockener Luft (0 % rLF) bei einer Wiederholfrequenz von 1000 Hz

Ausgehend von dem im Kapitel 1.4.2 vorgestellten Modell sind in Abbildung 2.5 die ersten möglichen Reaktionen am Beispiel von Polystyrol durch vom Plasma erzeugte Spezies systematisch dargestellt.

Initiiert werden diese Reaktionen durch die Abtrennung eines Wasserstoffatoms vom aliphatischen oder aromatischen Teil des Polystyrols durch atomaren Sauerstoff oder Hydroxylradikale. In einem nächsten Schritt können aus den gebildeten Alkylradikalen durch Reaktionen mit atomarem Sauerstoff oder Ozon Alkoxyradikale ($-O^{\bullet}$) oder Peroxyradikale ($-OO^{\bullet}$) gebildet werden. Der Anstieg des polaren Anteils wird somit durch Alkoxyradikale, Peroxyradikale und Carbonylgruppen ($-C=O$) hervorgerufen. Carbonylgruppen können, wie in Abbildung 2.5 gezeigt,

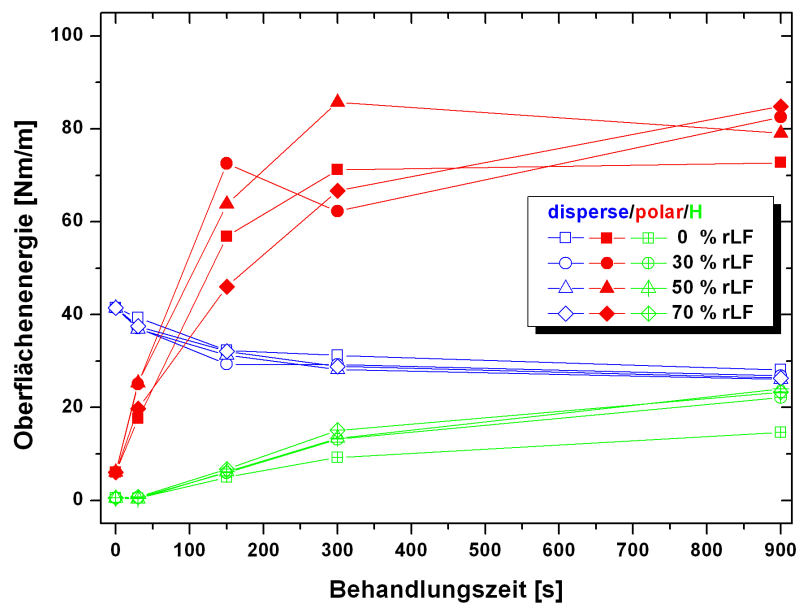


Abbildung 2.4: Oberflächenenergien für die einzelnen Bindungskomponenten in Abhängigkeit von der Behandlungszeit bei einem Abstand zwischen Probe und Dielektrikum von 0,6 mm für verschiedene Luftfeuchtigkeiten

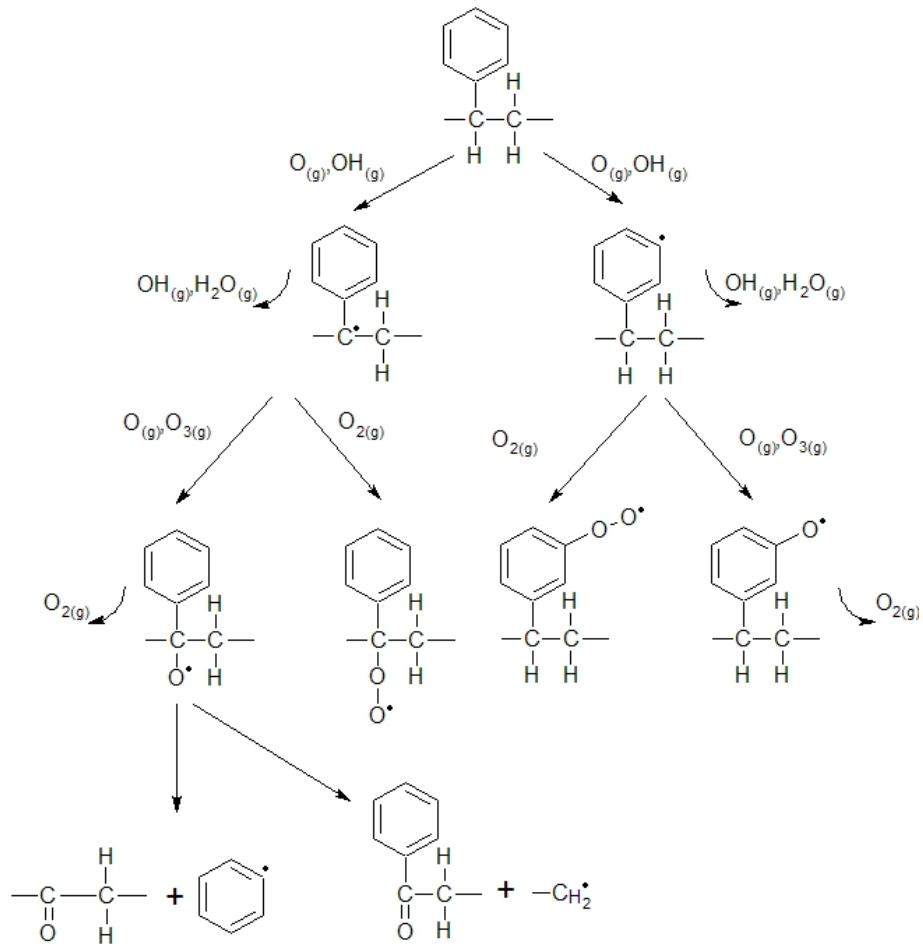


Abbildung 2.5: Erste Reaktionsschritte der Polystyroloberfläche bei Kontakt mit im Luftplasma gebildeten Spezies in Anlehnung an das Modell von Dorai et al. [28] (vgl. Tabelle 1.3)

aus Alkoxyradikalen durch β -Spaltung und Ketonbildung am tertiären Kohlenstoffatom oder am sekundären Kohlenstoffatom als Aldehyde entstehen. Die Carbonylgruppen der Ketone und Aldehyde, die im FTIR Spektrum (Abbildung 2.6) im Bereich von 1750 cm^{-1} bis 1715 cm^{-1} detektierbar sind, erlauben auf Grund der Überlagerung zwar eine qualitative, jedoch aber keine quantitative Aussage. Es ist eine Zunahme der Keton- und Aldehydbanden der 30 s Probe gegenüber unbehandeltem Polystyrol zu erkennen. Im Bereich von 1715 cm^{-1} bis 1670 cm^{-1} sind C=O Streckungen zu finden, die Arylketonen zugeordnet werden können. Der Wellenzahlbereich von 3600 cm^{-1} bis 3200 cm^{-1} (Abbildung 2.6) zeigt die Zunahme von C=O Obertonstreckungen. O-H Streckungen können in diesem Bereich auf Grund des gleich gebliebenen Wasserstoffbrückenbindungsanteils ausgeschlossen werden. Somit können zu diesem Zeitpunkt noch keine Phenole, Alkohole oder Carbonsäuren auf der Polystyroloberfläche entstanden sein.

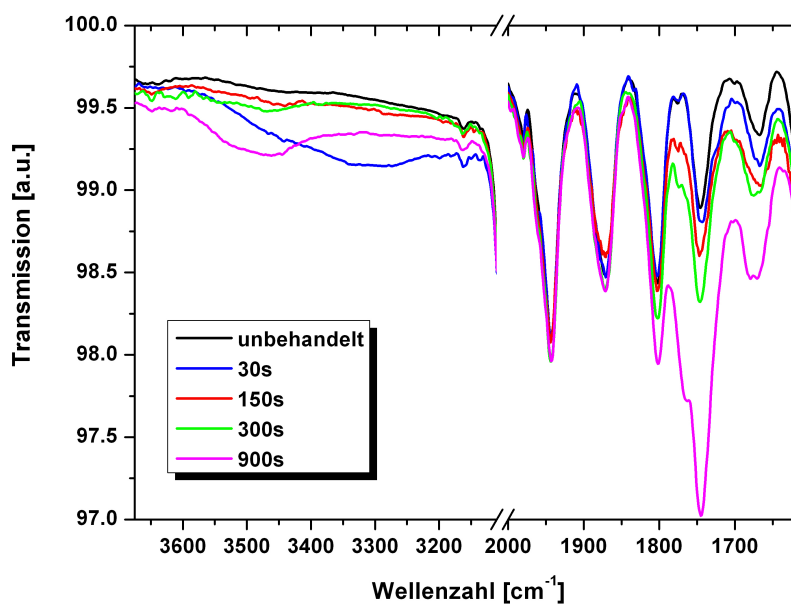


Abbildung 2.6: FTIR Spektren in Abhängigkeit von der Behandlungszeit in trockener Luft (0 % rLF) bei einer Wiederholfrequenz von 1000 Hz und einem Abstand zwischen Probe und Dielektrikum von 0,6 mm

Weitere O-Doppelbindungen sind durch Ringspaltung mit nachfolgender Anlagerung von Sauerstoff möglich. Der Abfall des dispersen Anteils kann durch Verringerung der unpolaren Gruppen durch β -oder Ringspaltung verursacht werden.

Bei Versuchen über eine Behandlungsdauer von 30 s hinaus ist zu erkennen, dass weitere chemische Reaktionen zwischen der Gasphase und der Oberfläche, aber auch in der Oberfläche stattfinden. Der Kontaktwinkel für Wasser nimmt weiter ab, wobei die 1. Ableitung des Kontaktwinkels über die Zeit stetig abnimmt, so dass sich nach einer endlichen Behandlungsdauer Sättigungseffekte einstellen. Nach einer Behandlungszeit von 900 s weisen die Polystyroloberflächen einen Kontaktwinkel von $42,7^\circ$ für Wasser auf. Betrachtet man die einzelnen Komponenten der Oberflächenenergie, so sind auch hier Sättigungseffekte mit zunehmender Zeit zu erkennen. Das weitere Ansteigen des Anteils der Wasserstoffbrückenbindungen und des polaren Anteils mit längeren Behandlungszeiten lässt sich durch die Bildung von Phenole, Alkohole oder Carbonsäuren erklären. Weitere β -Spaltungen, verbunden mit der Bildung von C=O Bindungen, führen zu dem gemessenen Absinken des dispersen Anteils der Oberflächenenergie. Bestätigen lässt sich die Bildung von Alkoholen mittels der Verschiebung der Absorptionsbande von 3300 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen (siehe Abbildung 2.6), welche aus O-H Streckschwingungen resultiert. Durch intermolekularen Austausch von Wasserstoffatomen werden unter Neubildung von Alkylradikalen, Alkoxy- und Peroxyradikale zu -OH und -OOH Gruppen umgewandelt. Da Hydroperoxide jedoch zu einem Ansteigen des dispersen Anteils führen, aber ein Absinken des Gleichen zu beobachten ist, ist davon auszugehen, dass Ring- und β -Spaltungen in größerer Anzahl auftreten.

Eine Substituierung des Benzolringes bei längeren Behandlungen lässt sich anhand von Absorptionen bei 1670 cm^{-1} erkennen. Diese Absorptionen deuten auf einen ortho-, meta- und para-substituierten Benzolring hin. Banden von metasubstituiertem Benzol lassen sich bei 1746 cm^{-1} und 1802 cm^{-1} finden. Auch 1,3,5-tri-substituiertes Benzol kann bei besonders langen Behandlungszeiten anhand einer Absorptionsbande bei 1764 cm^{-1} nachgewiesen werden. Neben der Substituierung sind auch wie bei Dorai et al. [28] beschrieben Quervernetzungen im Polymer möglich.

Aus Abbildung 2.3 ist zu erkennen, dass der Wasserkontaktwinkel mit steigender relativer Luftfeuchtigkeit für die verschiedenen Behandlungszeiten stärker abnimmt. Der disperse Anteil der Oberflächenenergie ist für Luftfeuchtigkeiten ab 10 % im Rahmen der Messgenauigkeiten konstant für gleiche Behandlungszeiten und geringer im Vergleich zu Behandlungen in trockener Luft. Wie schon in Tabelle 2.1 gezeigt, unterliegt der polare Anteil sehr großen Schwankungen, welche aus den Eigenschaften der verwendeten Messflüssigkeiten herrühren. Auf Grund dessen kann der polare Anteil trotz der großen Schwankungen in Abbildung 2.4 als unabhängig von der relativen Luftfeuchtigkeit des Prozessgases angesehen werden. Oberhalb von 0 % relativer Feuchtigkeit des Prozessgases zeigt der Anteil der Wasserstoffbrückenbindung nur eine geringe Abhängigkeit von dieser, liegt aber etwas höher als im Fall trockener Luft.

Ausgehend von diesen Veränderungen kann auf eine steigende Konzentration der Hydroxylradikale bei ansteigender relativer Luftfeuchtigkeit geschlossen werden. Eine steigende Luftfeuchtigkeit fördert die Bildung von Alkoholen, Phenolen und Hydroperoxiden. Hydroperoxide führen zwar zu einem Ansteigen der Wasserstoffbrückenbindungen, erhöhen aber auch gleichzeitig den dispersen Anteil der Oberflächenenergie. Die vermehrte Bildung von Peroxidradikalen und damit verbundene Bildung von Hydroperoxiden kann bei sinkendem dispersen Anteil nur stattfinden, wenn gleichzeitig eine höhere Rate an β -Spaltung oder Ringspaltung vorliegt.

Abbildung 2.7 zeigt die Veränderungen der FTIR Spektren für 300 s und 900 s Behandlungszeit bei 0 % und 30 % relativer Prozessgasfeuchtigkeit. Die Absorption der intermolekularen Streckschwingungen von O-H nimmt im Bereich um 3500 cm^{-1} mit zunehmendem Feuchtigkeitsgehalt, trotz steigender Wasserstoffbrückenbindungsanteile, ab. Dies lässt sich nur durch die verschiedenen Nachweistiefen der beiden Messverfahren und mit der tatsächlichen Tiefe der Veränderungen der Polystyroloberfläche erklären. Die Eindringtiefe der FTIR Analytik beträgt rund $10\text{ }\mu\text{m}$, wohingegen die Kontaktwinkelmessung nur auf der obersten Atomlage der Oberfläche stattfindet. Hieraus folgt, dass die Bildung von Alkoholen und Phenolen nicht direkt auf der Oberfläche stattfindet. Die Oberton-

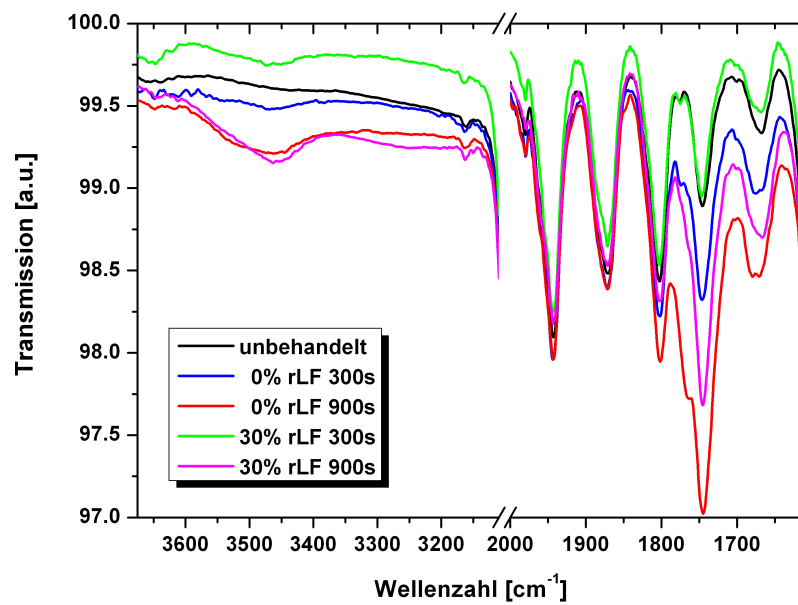


Abbildung 2.7: FTIR Spektren für 300 s und 900 s Behandlungszeit bei 0 % und 30 % relativer Luftfeuchtigkeit, einer Wiederholfrequenz von 1000 Hz und einem Abstand zwischen Probe und Dielektrikum von 0,6 mm

schwingungen der C=O Bindungen zeigen keine Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit. Auch die Stärke der Absorptionsbanden, welche eine Substituierungen des aromatischen Teils anzeigen, liegen über denen des unbehandelt Polystyrols, sind aber geringer als bei Behandlungen in trockener Luft. Da die Substituierungen jedoch auch mit der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind, müssen auch diese Veränderungen in gewissen Tiefen und nicht direkt auf der Oberfläche stattgefunden haben.

Die Abnahme der Veränderungen in der Tiefe mit steigender Luftfeuchtigkeit lässt sich durch die abnehmende Konzentration an atomaren Sauerstoff in der Gasphase erklären (siehe Kapitel 1.4.1). Durch atomaren Sauerstoff werden wie gezeigt zunächst Alkylradikale und daraus dann Alkoxi- und Peroxiradikale gebildet, die sich durch intermolekulare Austauschreaktionen in die Tiefe des Polystyrols fortpflanzen können.

Aus Abbildung 2.8 wird erkennbar, dass sich schon für Abstände von 2 mm zwischen Probe und Dielektrikum der Elektrodenanordnung die Werte der Oberflächenenergien, denen von unbehandeltem Polystyrol annähern. Während sich Wasserstoffbrückenbindungen und der disperse Anteil oberhalb von 2 mm nahezu nicht mehr ändern, zeigt der polare Anteil der Oberflächenenergie noch eine geringe Abnahme. Der polare Anteil, zeigt zudem bei einem Abstand oberhalb von 2 mm eine deutliche Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit des Prozessgases. Aus dem Verlauf der Wasserstoffbrückenbindungen kann gefolgert werden, dass die Hydroxylradikale eine Reichweite, ausgehend vom Dielektrikum, von weniger als 2 mm besitzen. Die sehr geringen Änderungen des polaren und dispersen Anteils zwischen 2 mm und $10,5\text{ mm}$ werden durch die hohe Lebensdauer von Ozon erklärt. Auch für Abstände von mehr als 10 mm kann wegen der großen Reichweite des Ozones noch atomarer Sauerstoff durch Zerfall gebildet werden, welcher eine Funktionalisierung der Oberfläche initiiert und zur Bildung von Aldehyden und Ketonen führt.

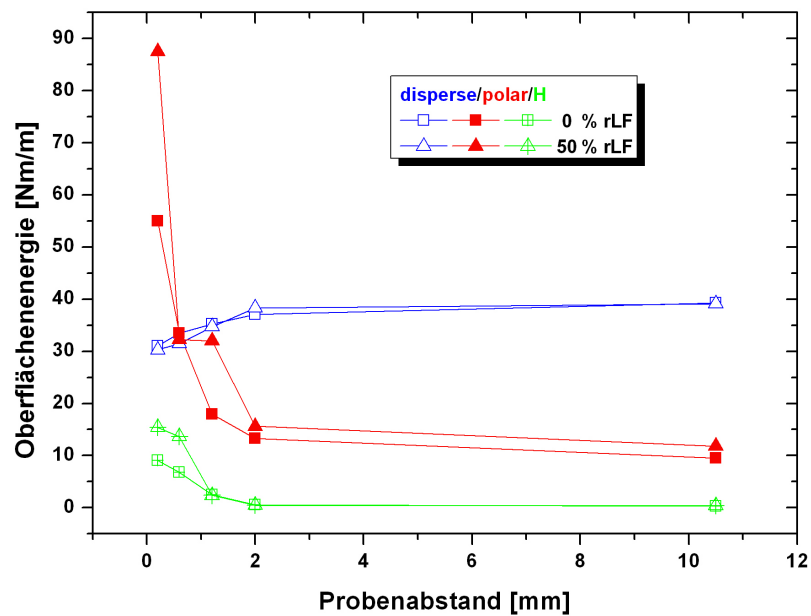


Abbildung 2.8: Oberflächenenergie für verschiedene Abstände (0,2 mm bis 10,5 mm) zwischen Probe und Dielektrikum bei einer Behandlungszeit von 150 s und von 0 % und 30 % relativer Luftfeuchtigkeit

2.3 Mikrobiologie

Wie in Kapitel 1.2.1 dargestellt, wird in der Literatur die antimikrobielle Wirksamkeit verschiedener im Plasma generierter Spezies beschrieben. Viele dieser Studien erklären die Inaktivierung von Mikroorganismen durch, von Edelgasplasmen ausgesandte Ultraviolettstrahlung oder durch elektrische Aufladung und Disruption der Zellmembran. In diesem Kapitel soll der Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit und der Energie, welche in das Plasma eingebracht wird, auf die Abtötung von besonders resistenten *Bacillus atrophaeus* Sporen im trockenen Zustand aufgezeigt werden (siehe auch Hähnel et al. [4]). Die Vorbereitung der Teststreifen und der Versuchsablauf erfolgten entsprechend des in Kapitel B.5 beschriebenen Protokolls. Der Abstand zwischen den Teststreifen und dem Dielektrikum der Elektrodenanordnung wurde für alle Versuche auf $0,6\text{ mm}$ eingestellt. Dieser Abstand resultiert aus Überlegungen zur späteren Umsetzung des Systems zur Behandlung von Multititerplatten. Hat das zu entwickelnde Plasmasystem einen Durchmesser von 5 mm , so beträgt der Abstand zwischen dem Plasmasystem und der Wand eines Wells ca. $0,5\text{ mm}$ bis $0,7\text{ mm}$.

Abbildung 2.9 zeigt die auf den Teststreifen verbliebenen koloniebildenden Einheiten für relative Prozessgasfeuchtigkeiten von 0% bis 70% für Behandlungszeiten von $2,5\text{ min}$ und $7,5\text{ min}$. Es ist deutlich die Abhängigkeit der Reduktion der Sporen von der Feuchtigkeit zu erkennen. Dies steht in guter Korrelation zu den punktuellen Untersuchungen von Trompeter et al. [27]. Das Ansteigen der Reduktionsfaktoren in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit zeigt ein nichtlineares Verhalten. Während in trockener Luft für beide Behandlungszeiten keine Reduktion nachgewiesen werden konnte, wurden im Rahmen der Nachweisgrenze bei 70% relativer Gasfeuchte alle Sporen inaktiviert. Die Nachweisgrenze für diese Versuche betrug 10 koloniebildende Einheiten. Basierend auf der Arbeit von Dorai et al. [28] und den hier gezeigten Ergebnissen kann den Hydroxylradikalen eine große Bedeutung beigemessen werden. Hydroxylradikale können, im Gegensatz zu anderen reaktiven Sauerstoffspezies und Wasserstoffperoxid direkt, durch Elektronenstöße mit Wassermolekülen gebildet werden. Weiterhin sind Hydroxylradikale an vielen Gasphasenreaktionen beteiligt (siehe Abbildung 1.8) und

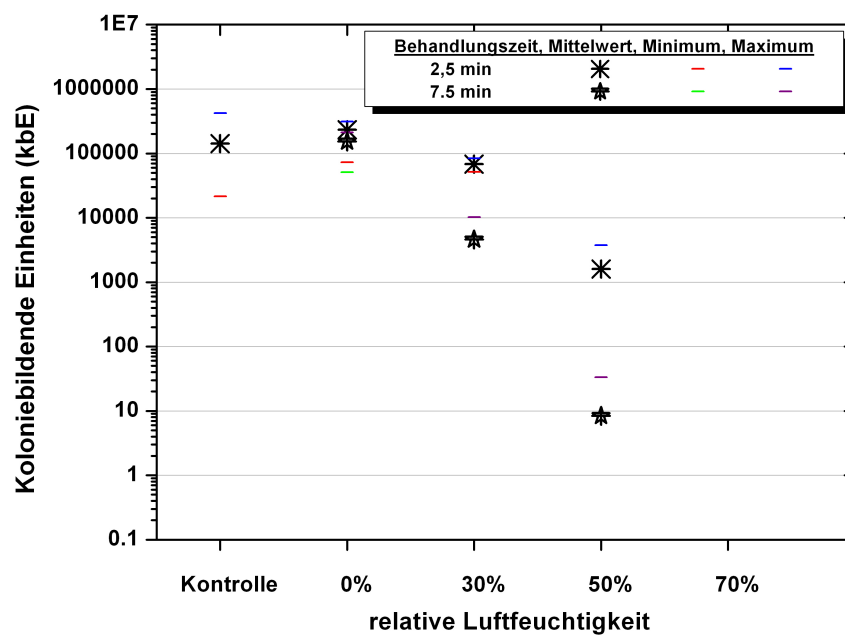


Abbildung 2.9: Koloniebildende Einheiten in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und der relativen Luftfeuchtigkeit des Prozessgases; Spannung 10 kV, Plasma An-Zeit 25 %

besitzen die höchste Reaktivität unter den reaktiven Sauerstoffspezies. Dorai et al. haben auch gezeigt, dass mit steigender Feuchtigkeit die Konzentrationen an Ozon, atomarem Sauerstoff und reaktiver Stickstoffspezies sinken. Um Kondensationseffekten auf den Proben vorzubeugen, wurden keine höheren Luftfeuchtigkeiten als 70 % verwendet. Auf den Proben kondensierte Feuchtigkeit würde in einem Luftplasma einer Ansäuerung unterliegen [109].

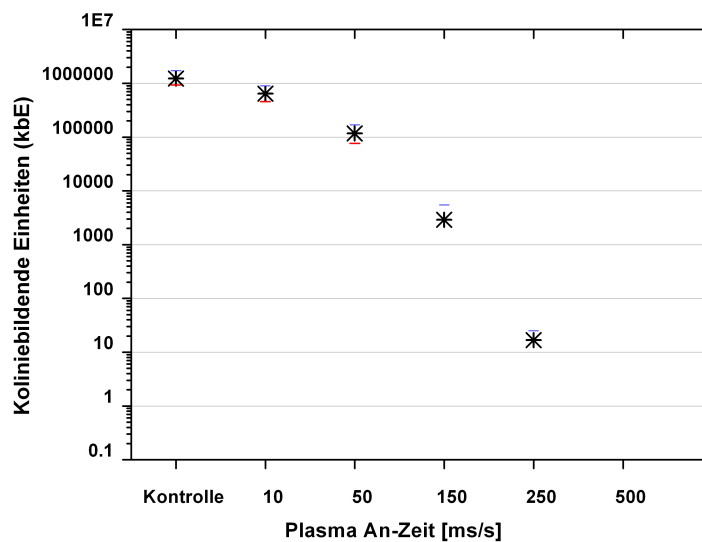


Abbildung 2.10: Koloniebildende Einheiten in Abhängigkeit von der Plasma An-Zeit; Spannung 9 kV, relative Luftfeuchtigkeit 60 %

Da die Anzahl der gebildeten Spezies von der in das Plasma eingebrachten Energie abhängig ist, wurde bei einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 60 % die Plasma An-Zeit variiert. Eine längere Plasma An-Zeit bedeutet eine größere mittlere Leistung. Abbildung 2.10 zeigt die Abhängigkeit der Reduktion von der Plasma An-Zeit bei einer Spitzenspannung von 9 kV. Es zeigt sich eine exponentielle Abnahme der koloniebildenden Einheiten mit zunehmender Plasma An-Zeit. Wie in Gleichung 1.10 gezeigt, wird die Plasmaleistung weiterhin von der maximalen Amplitude und der Frequenz der Versorgungsspannung bestimmt. Sie stellen

somit weitere Möglichkeiten zur Veränderung der mittleren Plasmaleistung dar. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass höhere mittlere Plasmaleistungen zu größeren Abtötungsraten führen.

2.4 Veränderung der Mikroorganismen

Bakteriensporen können mittels Plasma bei kleinen mittleren Leistungen in feuchter Luft innerhalb weniger Minuten vollständig inaktiviert werden. Wie argumentativ gezeigt wurde, ist das Hydroxylradikal auf Grund seiner sehr hohen Reaktivität von großer Bedeutung. Aus der Literatur sind einige rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von plasmabehandelten und unbehandelten Mikroorganismen bekannt [20, 110–114]. Jedoch kann aus solchen Aufnahmen nur ein zweidimensionaler Eindruck gewonnen werden, da Höheninformationen fehlen. Kuo et al. [114] berichten von rastkraftmikroskopischen Aufnahmen von *Bacillus cereus* Sporen nach Behandlung mit einem Mikrowellenplasma in Luft. Da Aufnahmen der gleichen Sporen vor und nach der Behandlung nicht vorhanden sind, können keine Aussagen über absolute Veränderungen der Morphologie der Sporen getroffen werden. Im folgenden sollen morphologische Veränderungen von *Bacillus atrophaeus* Sporen in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit und der Behandlungszeit diskutiert werden. Identische Sporen wurden vor und nach jedem Behandlungsschritt vermessen.

Eines der größten Probleme dieser Untersuchungen war der die Sporen einhüllende Biofilm. Um die Veränderungen der Sporen besser studieren zu können, wurde der Biofilm entsprechend des in Kapitel B.4.3 beschriebenen Protokolls entfernt. Bevor der Biofilm entfernt wurde, diente er als eine Art 'Kleber' zwischen Sporen und den verwendeten Substraten. Ohne diesen Schleim war die Adhäsion der Sporen auf den Substraten sehr klein, was zu einem Ablösen der Sporen von der Oberfläche auch im Nicht-Kontakt Modus führte. Auf der Oberfläche blieb nur ein Ring mit einer mittleren Höhe von 50 nm aus Resten des Biofilmmaterials zurück. Dieser Effekt zeigt das sehr geringe vertikale Anhaftungspotential der Sporen. Unter optimal gewählten Bedingungen konnten im Kontaktmodus keine Ablösungen beobachtet werden. Daher wurden alle weiteren Messungen im Kontaktmodus durchgeführt.

Ein zweites Problem war die Wahl des Substrates. Es sollte unverändert nach den Plasmabehandlungen sein und eine Wiederfindung der Sporen ermöglichen. Als ein gutes Material für die Substrate haben sich Glimmerplättchen erwiesen. Diese sind auf Grund ihrer chemischen Zusammensetzung stabil gegenüber Plasmabehandlungen und besitzen zufällig verteilte Riefen auf der Oberfläche.

Typische Höhen der Sporen lagen im Bereich von 670 nm bis 830 nm . Die Höhen unterlagen den bei biologischen Systemen üblichen Schwankungen, wurden aber zudem durch Biofilmmaterial beeinflusst, welche nach der Aufreinigung in der Sporensuspension verblieben. Aus diesem Grund ist für eine absolute Bewertung der Höhenveränderung eine Messung vor und nach Plasmabehandlung an den gleichen Sporen notwendig.

Eine typische Zeitreihe von AFM Aufnahmen ist in Abbildung 2.11 dargestellt. Für die jeweiligen Zeiten sind die dreidimensionale Darstellung sowie eine Draufsicht mit der für das darunter liegende Höhenprofil gezeigten Vermessungslinie, abgebildet. Die Größe der gezeigten Scanbereiche betrug $6\text{ }\mu\text{m}$. Um die Position eindeutig wiederzufinden, wurden zuvor $25\text{ }\mu\text{m}$ Bereiche vermessen. Die beiden abgebildeten Sporen haben im unbehandelten Zustand nahezu gleiche Ausgangshöhen. Nach einer Plasmabehandlung von 5 min bei 70% relativer Luftfeuchtigkeit und einem Probenabstand zum Dielektrikum von $0,6\text{ mm}$ hat sich die Höhe der Sporen schon auf weniger als die Hälfte reduziert. Weitere 5 min Plasmabehandlung unter den gleichen Bedingungen führten wiederum zu einer Reduzierung der Sporenhöhe. Nach den insgesamt 10 min Behandlungszeit weisen die beiden dargestellten Sporen trotz gleicher Ausgangshöhe eine Differenz von 100 nm auf. Ein Ursache hierfür kann im umhüllenden Biofilm liegen, der zuvor nicht vollständig beseitigt werden konnte. Schon vor der Behandlung sind kleine Biofilmreste in der direkten Umgebung der Sporen sichtbar. Ein weiterer Hinweis auf diese Schleimreste wird nach den ersten 5 min Plasmabehandlung deutlich. In der AFM Aufnahme haben sich neben den Sporen weitere kleine Objekte gebildet. Durch scheinbar veränderte Oberflächeneffekte hat sich der zuvor dünn auf der Sporen- und Substratoberfläche befindliche Schleim zusammengezogen. Staubpartikel aus der Umgebungsluft können ausgeschlossen werden, da sie deutlich größer als die abgebildeten Objekte sind. Sporen und Biofilm werden

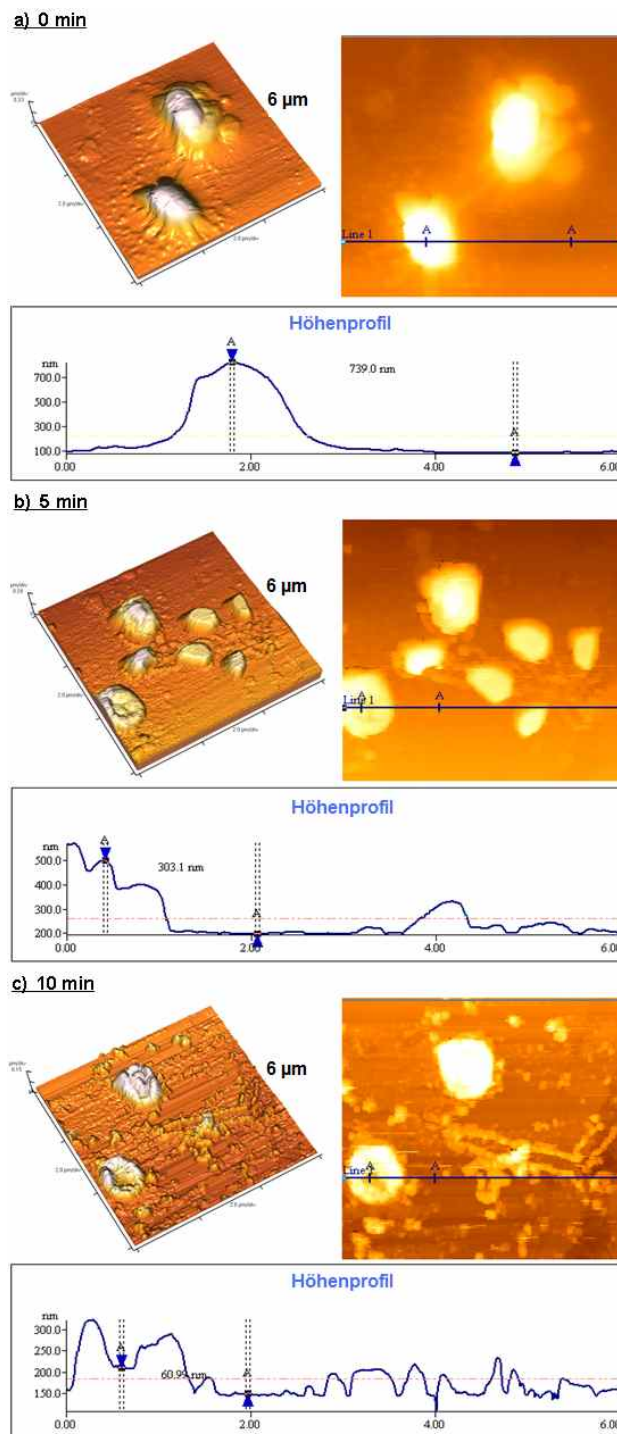


Abbildung 2.11: Kontakt-AFM Aufnahmen der gleichen Region und Sporen vor und nach 5 min und 10 min Plasmabehandlung bei 70 % relativer Luftfeuchtigkeit; Hochspannung 12 kV, Plasma An-Zeit 25 %, Abstand zwischen Substrat und Elektrode 0,6 mm

durch die Plasmabehandlung abgetragen. Es hat sich in den Untersuchungen gezeigt, dass einzeln liegende Sporen deutlich schneller abgetragen werden als Sporen, die in Gruppen vorlagen. Weiterhin besitzt der Biofilm eine deutlich größere Resistenz gegenüber dem Plasma. Ein Grund für diese erhöhte Resistenz kann im größeren Wassergehalt des Biofilms liegen. Treten Sporen in größeren Ansammlungen auf, so befand sich zwischen und auf ihnen immer eine deutliche Menge an Schleim, der so als Schutzschicht fungierte. Eine weitere mit den Ergebnissen konforme Erklärung für die höhere Resistenz des Biofilmmaterials kann sein, da das Plasma eine konstante Anzahl an reaktiven Spezies pro Fläche bildet, muss die Abtragsrate von der Menge an organischem Material und den damit verbundenen Reaktionsstellen, abhängig sein. Nach insgesamt 10 *min* Plasmabehandlung ist das Innere der Spore nahezu vollständig abgetragen, während ein äußerer Rand mit der doppelten Höhe noch vorhanden ist. Auch hier zeigt sich, dass es unterschiedliche Abtragsraten für die verschiedenen Bereiche einer Spore gibt. Da aber schon nach den ersten 5 *min* die Höhen stark reduziert sind, ist davon auszugehen, dass diese Sporen nicht mehr vermehrungsfähig sind. Dies steht auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Kapitel 2.3.

Tabelle 2.2: Höhenabnahme der Sporen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und relativen Luftfeuchtigkeit des Prozessgases

rel. Luftfeuchtigkeit	Δ Höhe [nm] der Sporen nach				
	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
30%	0	0	0	0	20 - 150
50%	0	0	0	0	20 - 170
70%	5 - 115	10 - 125	90 - 140	270 - 440	530 - 660

In Tabelle 2.2 sind die Abnahmen der Höhen in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit und der Behandlungszeit dargestellt. Hier wird der starke Einfluss der Luftfeuchtigkeit deutlich. Für weniger als 70 % relativer Gasfeuchtigkeit konnten erst nach 10 *min* Behandlungszeit Abnahmen um 20 *nm* bis 170 *nm* gemessen werden. Die Agglomeration des Schleims und der Abtrag durch das Plasma stehen in Konkurrenz zueinander, weshalb für kleine Zeiten und geringen Luftfeuchtigkeiten keine Abträge bestimmt werden konnten. Bei einer relati-

ven Luftfeuchtigkeit von 70 % konnten nach einer Minute Behandlungszeit schon Höhenabnahmen von bis zu 115 *nm* registriert werden.

Die in Tabelle 2.2 gezeigten Ergebnisse stehen in einer guten Korrelation mit den mikrobiologischen Resultaten aus Kapitel 2.3. An dieser Stelle kann geschlussfolgert werden, dass in Luftplasmen das Hydroxylradikal nicht nur einen maßgeblichen Einfluss auf die Abtötung von Mikroorganismen hat, sondern das steigende Abtötungsraten bei zunehmender Prozessgasfeuchte mit einer deutlichen morphologischen Veränderung der Sporen einher gehen [115].

2.5 Zusammenfassung der Voruntersuchungen

Ziel der Voruntersuchungen war die Machbarkeit der antimikrobiellen Behandlung mittels einer Oberflächen-DBE in Luft zu prüfen. Neben den mikrobiologischen Versuchen an Bakteriensporen wurden die Plasmeeigenschaften, die Veränderung der Polystyroloberflächen sowie die durch das Plasma an den Mikroorganismen hervorgerufenen Veränderungen untersucht. Zusammenfassend ergaben sich die folgenden Ergebnisse:

- Die Keimreduktion mittels einer Oberflächen-DBE in Luft bei Atmosphärendruck ist für Abstände von $0,6\text{ mm}$ zum Substrat auch bei kleinen mittleren Plasmaleistungen möglich. Sie steigt bei Zunahme der relativen Luftfeuchtigkeit und der Behandlungszeit an. Bei einer relativen Gasfeucht von 70% sind nach einer Behandlungszeit von $2,5\text{ min}$ mehr als vier Log-Stufen an Sporen von *Bac. atrophaeus* abgetötet. Durch ein Erhöhen der Plasmaleistung wird ebenfalls der antimikrobielle Effekt der Plasmabehandlung gesteigert. Da das verwendete Luftplasma keine nennenswerten Emissionen unterhalb von 300 nm besitzt und die Keimreduktion mit zunehmender Luftfeuchtigkeit ansteigt, wird dem Hydroxylradikal, welches direkt durch Elektronenstoßprozesse aus Wasser gebildet wird, eine bedeutende Rolle beigemessen.
- Mit dem verwendeten Plasma ist es möglich, die Bakteriensporen abzutragen. Dieser Effekt nimmt ebenfalls mit steigender relativer Luftfeuchtigkeit zu und wird auch durch die Wirkung der Hydroxylradikale begründet.
- Es findet eine Oxidation der Polystyroloberfläche statt. Mit zunehmender Behandlungszeit sinkt der Wasserkontaktwinkel der Proben. Gleichzeitig nimmt der polare Anteil der Oberflächenenergie zu. Die Veränderungen der Oberflächen sind vom Abstand zwischen Elektrode und Probe abhängig und nehmen mit wachsendem Abstand ab. Oberhalb von 2 mm sind nur noch geringfügige Veränderungen messbar.

Kapitel 3

Konstruktive Umsetzung

Aus den zuvor für zweidimensionale Substrate gewonnenen Ergebnissen werden in diesem Kapitel zwei Umsetzungsmöglichkeiten für die Behandlung von 96er Mikrotiterplatten beschrieben. Als zwei wesentliche Konsequenzen aus den Voruntersuchungen sind eine hohe relative Luftfeuchtigkeit während der Plasmabehandlung und ein möglichst geringer Abstand der Elektrode, und damit des Plasmas, der zu behandelnden Oberfläche zu nennen.

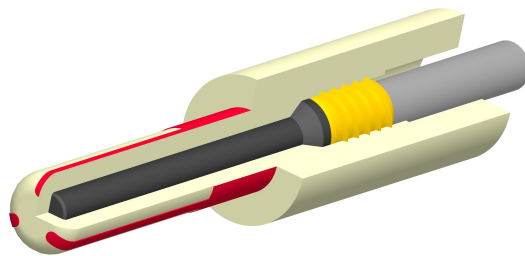


Abbildung 3.1: *Schnitt durch Gesamtdarstellung des Aufbaus eines Plasmafingers*

Das erste der beiden Systeme ist, wie im Fall der zweidimensionalen Voruntersuchungen, eine Oberflächen-DBE. Beide zum Elektrodensystem gehörende Elektroden sind in einem Finger integriert, so dass die Mikrotiterplatte nicht Bestandteil der Entladungsgeometrie ist. Mit dieser Anordnung ist auch die Behandlung

oberhalb von Flüssigkeiten in 96er Multiwellplatten möglich.

Die zweite der beiden Varianten ist eine Kombination von Korona- als auch DBE-entladung. In dieser Anordnung bildet die Mikrotiterplatte die dielektrische Barriere in einer Punkt-Ebene Koronaanordnung. Durch diese Barriere können an die Elektroden höhere, als für eine reine Koronaanordnung mögliche, Spannungen angelegt werden. Ohne eine dielektrische Barriere würde es zu einer Funkenentladung zwischen den Elektroden kommen. Eine Funkenentladung hätte eine punktuell stark thermische Belastung der Polystyroloberfläche, als auch eine inhomogene Behandlung, zur Folge.

3.1 Systemaufbau Plasmafinger

Abbildung 3.2 zeigt den Aufbau einer Einheit zur simultanen Plasmabehandlung aller Wells einer 96er Multiwellplatte mittels einer Oberflächen-DBE. Die laterale Größe des Gehäuses, in dem die Plasmafinger integriert sind, entspricht in seinen Ausmaßen denen einer automatisierten Laborposition (ALP) ($100 \times 152 \text{ mm}$). Die Gehäusehöhe oberhalb der Ebene, auf welcher die Multititerplatten abgestellt werden, beträgt ohne Gas und Stromanschlüsse weniger als 70 mm .

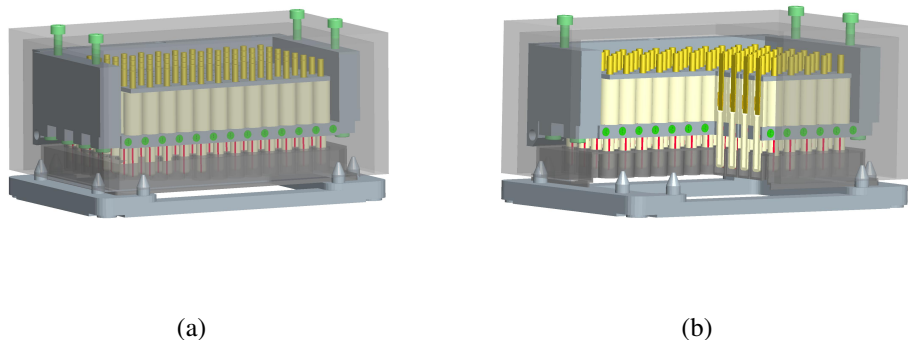


Abbildung 3.2: Systemaufbau mit Plasmafingern zur Behandlung von 96er Wellplatten (a), Schnittdarstellung (b)

Die Plasmafinger sind über Halter an festen Positionen entsprechend des von der Society for Biomolecular Screening [116] erarbeiteten Standards im Gehäuse fixiert und können zusammen mit diesem in die Mikrotiterplatten abgesenkt werden. Die Fixierung der Plasmafinger erfolgt über verschraubte Spannstreifen, welche jeweils 6 Plasmafinger auf geometrisch definierten Positionen drücken. Auf jedem der vier Halter sind so 24 Plasmafinger montiert.

Das Prozessgas wird über einen Stutzen in der Oberseite des Gehäuses zugeführt und über eine Gasdusche leicht oberhalb der Multiwellplatten gleichmäßig verteilt. Das aus dem Gehäuse verdrängte Prozessgas wird über einen Abgasstutzen abgeführt. Die elektrischen Anschlüsse befinden sich ebenfalls auf der Gehäuseoberseite. Die ALP ist in der Form ausgebildet, dass sie mit einem darauf abgesetzten Gehäuse eine gasdichte, verschlossene Einheit bildet. Dadurch können keine im Plasma gebildeten Spezies (z.B. Ozon und Stickstoffdioxid) in die Laborluft gelangen.

Plasmafinger

Ein Schnitt durch einen Plasmafinger ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die rot markierte strukturierte Elektrode ist den Innenwänden eines Wells zugewandt und auf der Außenseite des Dielektrikums aufgebracht. Die Gegenelektrode ist schwarz dargestellt und wird vollständig vom Dielektrikum eingeschlossen. Kontaktiert wird die Innenelektrode durch einen Gewindeeinsatz (gelb) und einem Gewindestift (grau). Die Entwicklungsstufen der äußeren Geometrie der Finger werden in Abbildung 3.3 gezeigt. Alle Finger besitzen eine Gesamtlänge von 40 mm. Davon werden 20 mm am oberen Ende für die Hochspannungsisolation verwendet. Der gesamte Grundkörper besitzt in der ersten Entwicklungsstufe einen äußeren Durchmesser von 5 mm, bei einer Wandstärke von 1,25 mm. Die Außenelektrode ist im Bereich des Halters 6 mm breit und umlaufend. Die längs der Oberfläche verlaufenden drei Elektrodenteile haben eine Breite von 0,8 mm.

Von der ersten zur zweiten Entwicklungsstufe ist der hinzugefügte Absatz oberhalb der strukturierten Elektrode deutlich zu erkennen. Um eine Ausbreitung des Plasmas in Richtung des oberen Endes auf der Außenseite des Fingers entlang der Innenelektrode zu unterbinden, wurde das Dielektrikum über eine Länge von

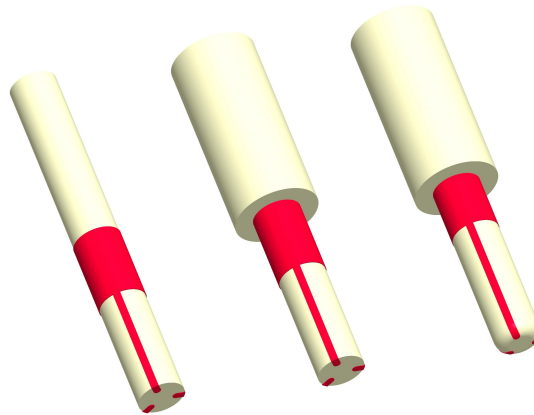


Abbildung 3.3: Entwicklungsstufen der Plasmafinger, letzte Stufe rechts

20 mm auf 8,8 mm verstärkt. Wie in Kapitel 1.3.1 erläutert, werden die Entladungseigenschaften unter anderem durch die geometrischen Parameter der Anordnung bestimmt. Ein Zunehmen der Dicke des Dielektrikums führt zu einer Abnahme der Dielektrikumskapazität, was nach Gleichung 1.6 wiederum zum Ansteigen der Schwellwertspannung V_{th} führt. Bei einer festen Maximalamplitude der Hochspannung unterhalb von V_{th} kommt es in diesem Bereich somit nicht mehr zum Zünden des Plasmas. Eine Ausbreitung des Plasma entlang der Außenseite der Finger in Richtung der Kontaktierung der inneren Elektrode und ein damit verbundener Kurzschluss zwischen beiden Elektroden wird somit verhindert.

Die dritte Entwicklungsstufe zeichnet sich nur durch eine geringfügige Modifikation im Bereich der kleinen Stirnseite der Plasmafinger aus. Die außen liegende Kante wurde durch einen Radius in der Größe der Wandstärke des Dielektrikums ersetzt. Die innen liegende Kante wurde in einen Radius 0,2 mm umgewandelt. Durch diese Modifikation wurde erreicht, dass die kürzeste Verbindung zwischen Innen- und Außenwandung an allen Punkten im Bereich der Oberflächenentladung einen gleichen Wert besitzt, was in der zweiten Entwicklungsstufe im Bereich der Kante an der Stirnseite nicht gegeben war. Weiterhin bildete die innere Kante zuvor einen Bereich besonders hoher Feldstärke (vergleiche Kapitel 1.3.2). Diese Veränderungen der Geometrie bedingen eine gleichmäßigere Ausbreitung des Plasmas.

Materialien und Fertigung

Auf Grund der hoch reaktiven Spezies innerhalb des Gehäuses müssen alle darin befindlichen Komponenten aus chemisch stabilen oder korrosionsbeständigen Materialien aufgebaut sein. Das Gehäuse im Rahmen dieser Versuche bestand aus Acrylglas und zeigte keine Alterungs- und Abnutzungserscheinungen. Dennoch sollte es im Routineeinsatz aus einem chemisch beständigerem Nichtleiter bestehen. Hierfür bietet sich Teflon an. Dieses kann, wenn eine Sichtkontrolle erforderlich ist mit einer Glasscheibe ausgestattet werden.

Alle im Gehäuse befindlichen Schrauben und metallischen Verschraubungen sind in einem nichtrostenden Stahl (z.B. 1.4301) auszuführen oder müssen mit Gold als Korrosionsschutzschicht versehen sein. Für Dichtungselemente in Verschraubungen sind Silikone und Teflon zu bevorzugen.

Sowohl die ALP als auch die Halter der Plasmafinger sind aus einem nichtrostenden Stahl zu fertigen. Die Halterungselemente sollten im Bereich von Kontaktstellen vergoldet sein, um möglichst geringe Kontaktwiderstände zu erreichen. Eine ganzflächige Vergoldung ist auf Grund der großen Materialquerschnitte nicht notwendig. Die Halter bilden die Kontaktierung der Außenelektroden aller Plasmafinger.

Die Plasmafinger (siehe Abbildung 3.1) sind eine komplexe Komposition verschiedener Materialien. Das Dielektrikum bestand im Rahmen der Versuche aus einem Polymer (SL-Tool[®]) und wurde mittels Stereolithographie (robotmech Rapid Prototyping, Koblach, Österreich) gefertigt. Da Polymere im Ausbreitungsbereich des Plasmas einem Abtrag unterliegen (siehe Kapitel 2.4), muss das Dielektrikum für den Routineeinsatz oder weiterreichende Untersuchungen aus einer chemisch resistenten Keramik gefertigt werden. Als geeignet hierfür hat sich Aluminiumoxid erwiesen [117]. Das Dielektrikum muss frei von Lufteinschlüssen sein und eine elektrische Durchschlagsfestigkeit von mindestens $15 - 20 \text{ kV/mm}$ besitzen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Polymer mit einer erneuerbaren Opferschicht aus Acrylharzlack (PLASTIK 70, CRC Industries Deutschland GmbH) überzogen.

Die Innenelektroden bestanden aus im Finger verpressten Graphitpulver. Hierdurch ließ sich eine blasenfrei, am Dielektrikum anliegende Elektrode herstellen. Der Durchgangswiderstand der Graphitelektrode betrug weniger als $2 \frac{\Omega}{cm}$. Die Kontaktierung erfolgte über einen Gewindestift (DIN 915), welcher in einem in den Kunststoff eingedrehten M3 Gewindeeinsatz (Trisert®) aus Edelstahl, verschraubt wurde. Durch den Gewindestift wurde auch die endgültige Verpressung der Graphitelektrode erzielt. Sämtliche Gewindestifte wurden über eine Lochplatte aus Edelstahl verschraubt und miteinander elektrisch verbunden.

Die Außenelektrode bestand aus einem mehrschichtigen System. Die Grundschicht bildete eine $600 nm$ dicke Kupferschicht, welche mittels einer Maske über einen Sputterprozess aufgebracht wurde. Darauf wurde galvanisch eine $25 - 30 \mu m$ dicke Kupferschicht abgeschieden. Da Kupfer leicht zur Oxidation neigt, wurde es mit Nickel- und einer abschließenden Goldschicht beschichtet. Für die Serienfertigung derartiger Finger sind das Material und die Aufbringung der Außenelektrode, wegen der zahlreichen Arbeitsschritte, zu überdenken. Eine Möglichkeit auf Grund der zu verwendenden Aluminiumoxidkeramik stellt die Dickschichttechnik eine Alternative dar. Dazu können im Siebdruckverfahren stark goldhaltige Pasten aufgebracht und bei hohen Temperaturen ($> 600^\circ C$) eingebrannt werden. Die so erhaltenen Schichten besitzen eine Dicke von ca. $15 \mu m$. Zusätzlich können die Elektrodenstrukturen im Dickschichtverfahren durch dielektrische Glasschichten verkapselt werden, was einen weiteren Schutz gegen den Einfluss des Plasma und der darin gebildeten Spezies, bietet.

3.2 Systemaufbau Korona-DBE

Der Aufbau des Korona-DBE Systems ist dem der Plasmafinger ähnlich (siehe Abbildung 3.2). Ein Teil der Elektrodenanordnung befindet sich zusammen mit der Gaszufuhr und- verteilung sowie der Abluft, im Gehäuseoberteil. Die zweite, flächenhaft ausgebildete Elektrode befindet sich im elektrisch isolierenden Gehäuseunterteil. Die Gesamthöhe des Systems beträgt ohne Anschlüsse rund $75 mm$.

Die im oberen Gehäuseteil befindlichen Nadelelektroden sind in ähnlicher Weise,

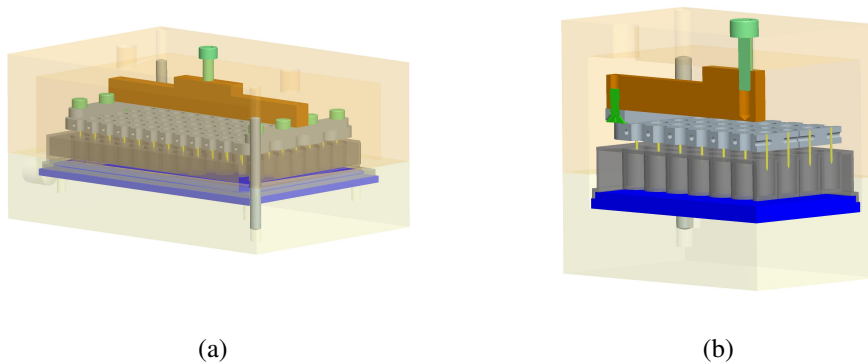


Abbildung 3.4: Systemaufbau einer Korona-DBE zur Behandlung von 96er Wellplatten (a), in der Schnittdarstellung (b); laterale Maße $100 \times 152 \text{ mm}$

entsprechend der im Standard für automatisierbare Multiwellplatten [116] definierten Positionen der Wells, montiert. Es werden auch hier jeweils zwölf Einzel Elektroden zu jeder der zwei Seiten der vier Halter befestigt. Die im Unterteil eingebrachte Gegenelektrode ist größer als die äußere Kontur, welche von der Gesamtheit der Einzelwells gebildet wird. Die Multititerplatte sitzt mit ihren Böden direkt auf dieser ebenen Elektrode auf.

Die Multiwellplatte ist in diesem System Bestandteil der Anordnung und fungiert als Dielektrikum. Aus diesem Grund ist ein Betrieb ohne eingelegter Wellplatte nicht zulässig. Im geschlossenen Zustand tauchen die Nadelelektroden mittig $2 - 3 \text{ mm}$ in die Wells ein.

Materialien und Fertigung

Für die Materialauswahl gelten die gleichen Kriterien wie für das mit Plasmafingern aufgebaute System (siehe Kapitel 3.1). Alle Kunststoffe sind vorzugsweise aus Teflon und alle Metallteile aus einem nichtrostenden Stahl oder mit einer vergoldeten Oberfläche herzustellen. Weiterhin können Glas und Keramik eingesetzt werden.

Das Gehäuse kann in der schon beschriebenen Weise gefertigt sein. Lediglich die Höhe und die Aufhängungspunkte für die Elektrodenhalter sind von dem System mit Plasmafingern verschieden. Die Halter sind mit M2 Gewindebohrungen

in Höhe der Nadelelektroden versehen. Mittels entsprechender Madenschrauben werden die ebenfalls aus rostfreiem Stahl geschnittenen Nadelelektroden im Halter fixiert. Um einen genügend großen Spalt zwischen der Unterseite der Halter und der Multiwellplatte zu erhalten, beträgt die freie Länge der Elektroden zwischen Spitze und der Unterseite der Halter mindestens 5 mm , selbst wenn die Elektroden 3 mm in die Wells eingetaucht sind. Der Durchmesser der Nadelelektroden beträgt $0,8\text{ mm}$. An den Haltern befinden sich Aussparungen zwischen den Nadelelektroden, um einen möglichst ungehinderten Gasaustausch im System zu ermöglichen.

Die untere flächig ausgebildete Elektrode ist ebenfalls aus nichtrostendem Stahl gefertigt. Sie kann zusätzlich mit einer ca. $0,2\text{ mm}$ dicken Teflonfolie belegt werden. Dies soll das elektrische Durchschlagen bei der Behandlung von Multititerplatten mit defekten Folienböden verhindern. Diese Elektrode ist mit möglichst feiner Oberflächenstruktur herzustellen, um eine Beschädigung der direkt darauf abgestellten Wellplatten zu verhindern.

Auf Grund dessen, dass die Multiwellplatten als Dielektrikum fungieren, gibt es an dieser Stelle keine Einschränkungen für die Materialauswahl. Im Fall von Wellplatten mit sehr dünnen Folienböden sind kumulative Behandlungszeiten von mehr als 5 min zu vermeiden, da der im Kapitel 2.4 gezeigte Abtrag von organischem Material auch an den Polymeroberflächen der Platten stattfindet. Dies führt zu einer Abnahme der Dicke des Dielektrikums und würde bei unterschreiten einer für die Isolation notwendigen Stärke, zu einer Bogenentladungen führen, was das System zerstören kann.

3.3 Systemkomponenten

Gasversorgung und Feuchtigkeitsregelung

Ein Schema des Gaslaufplanes ist in Abbildung 3.5 gezeigt. Das trockene und ölfreie Prozessgas Luft wird aus der Druckluftversorgung des Labors entnommen und mittels eines Druckreglers auf ca. 2 bar herunter geregelt, was mittels eines Manometers überwacht werden kann. Dem Druckregler ist ein elektromagnetisches Absperrventil nachgeschaltet, bevor der Gasstrom aufgeteilt wird. In jedem

dieser zwei Gasströme befindet sich ein elektromagnetisch angesteuertes Proportionalventil. Mittels der Proportionalventile können die Gasströme zueinander variiert werden. Einer der Gasströme wird durch ein System zur Gasbefeuchtung geleitet. Danach werden beide Gasströme wieder zusammengeführt und gelangen durch ein weiteres Absperrventil in das Plasmasystem. Nach dem Zusam-

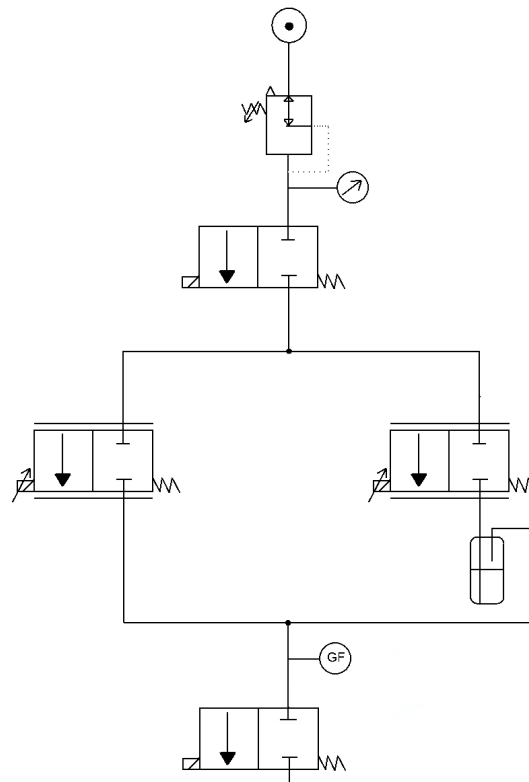


Abbildung 3.5: Gaslaufplan mit Möglichkeit zur Einstellung der Gasfeuchtigkeit

menführen des trockenen und feuchten Gasstromes wird die relative Luftfeuchtigkeit gemessen. Dieser Messwert wird fortlaufend von einem Steuerungscomputer ausgelesen. Die zur Regulierung einer vorgegebenen Feuchtigkeit notwendigen Signale werden vom Steuerungscomputer an die Proportionalventile gesendet. Das dem Plasmasystem zugewandte Absperrventil dient dem Schutz der Venti-

le und des Befeuchtungssystems vor den im Plasma gebildeten Spezies. Aus dem Plasmasystem in die Gasversorgung diffundierende Stickoxide und Ozon würden verwendete Dichtungselemente angreifen, das Wasser im Befeuchter ansäuern sowie den Luftfeuchtesensor zerstören.

Dem Druckregelventil kann zusätzlich ein elektronischer Durchflussmesser nachgeschaltet werden. Hierdurch kann die Überwachung und Sicherstellung eines Mindestgastroms erfolgen. Bietet das Befeuchtungssystem einen zu großen Strömungswiderstand, so kann dies mit einem zusätzlichen Drosselventil im Trockengasstrom ausgeglichen werden.

Das Befeuchtungssystem besteht aus einem Edelstahlzylinder und arbeitet im Wesentlichen wie eine Gaswaschflasche. Das Eingangsrohr besitzt an seinem Ende ein stirnseitig verschlossenes und mikroporiges Sinterrohr, welches ebenfalls aus Edelstahl gefertigt ist. Das Sinterrohr erlaubt eine feinperlige Verteilung der Luft im Wasser, was zu einer besseren Anfeuchtung führt. Durch in den Edelstahlzylinder eingebrachte Glaskugel ($\varnothing 3 - 4\text{ mm}$), bis etwas oberhalb des Sinterrohres, wird der Weg der Luftblasen und somit die Verweilzeit innerhalb des Wassers verlängert. Auch dies unterstützt die Anfeuchtung der Luft. Oberhalb der Wasseroberfläche befindet sich ein ausreichender Gasraum, damit keine Flüssigkeit zusammen mit der Luft in das Plasmasystem transportiert wird. Der Ausgang befindet sich am oberen Ende des Edelstahlzylinders.

Hochspannungsversorgung

Für den Routineeinnsatz eines solchen Plasmasystems kann ein von der hier verwendeten Hochspannungsquelle abweichendes System, zur Erzeugung einer alternierenden Hochspannung, verwendet werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Plasmaleistung sowie die Amplitude der Hochspannung denen dieser Arbeit gleich sind. Die Plasmaleistung nimmt, wie zuvor gezeigt, einen deutlichen Einfluss auf die Abtötungsrate, wohin gegen die Amplitude die Ausbreitungslänge des Plasmas auf der Oberfläche des Elektrodensystems oder des Volumens hat. Durch veränderte Ausbreitungslängen werden die Dichten der reaktiven Spezies beeinflusst. Weiterhin sollte die Frequenz des Hochspannungssignals in dem hier verwendeten Bereich liegen, da höhere Frequenzen, bei gleicher Plasmaleis-

tung, deutlich veränderte Pulsmuster erfordern würden. Dies würde sich in einer veränderten mittleren Dichte der im Plasma erzeugten Spezies äußern.

Die Signalform kann weitestgehend frei gewählt werden. Sie muss mit ähnlichen Beträgen zwischen positiver und negativer Amplitude, gegenüber dem Massepotenzial, alternieren. Unterschiedliche Beträge der Amplitude würden zu einer veränderten Ausbildung des Plasmas führen.

3.4 Schnittstellen für die Integration

Die Steuerung des Plasmasystems und der dazugehörigen Komponenten kann durch einen Steuerungscomputer erfolgen der folgende Schnittstellen mitbringen muss. Hinter den jeweiligen Bauteilen ist die notwendige Anzahl der vom Steuerungscomputer benötigten Aus- und Eingänge in Klammern angegeben. Die Regelung kann mit einer zeitlichen Auflösung von wenigen 10 Hz erfolgen.

1. Gasversorgung

(a) Absperrventile (1x Ausgang)

Die vor und nach den Proportionalventilen eingebauten Absperrventile können über ein elektronisches Relais direkt von einem Steuerungscomputer angesprochen werden. Sie werden durch das Anlegen einer 24V DC Spannung geschaltet.

(b) Proportionalventile (2x Ausgang)

Die Steuerung der Proportionalventile erfolgt über eine zwischengeschaltete Ansteuereinheit. Diese Ansteuereinheit setzt ein Gleichspannungssignal zwischen 0 und 10 V in ein frequenzgesteuertes Signal um, wodurch der Öffnungsquerschnitt der Proportionalventile bestimmt wird. Dabei entspricht 0 V dem geschlossenen und 10 V dem vollständig geöffneten Zustand der Ventile. Die Ausgabe der erforderlichen Spannungssignale kann auch durch einen externen DA-Wandler, der vom Steuerungscomputer angesprochen wird, erfolgen. Es wird eine Auflösung der Spannungssignale von mindestens 10 mV benötigt.

(c) **Feuchtigkeitssensor (1x Eingang)**

Der Feuchtigkeitssensor der Firma Hygrosens liefert ein der Luftfeuchtigkeit proportionales Gleichspannungssignal zwischen 0 und 10 V. Dieses kann, wenn für den Steuerungscomputer erforderlich, durch einen externen AD-Wandler umgesetzt werden. Es ist für eine ausreichende Regelung eine Auflösung von mindestens 100 mV erforderlich.

2. **Hochspannungsversorgung**

(a) **Amplitude der Hochspannung (1x Ausgang)**

Die Art der Ansteuerung der Amplitude der Hochspannung ist von der verwendeten Spannungsquelle abhängig.

(b) **Frequenz und Pulsmuster (min. 1x Ausgang)**

Die Steuerung der Frequenz der alternierenden Hochspannung ist wie die Amplitude der Hochspannung selbst von der verwendeten Spannungsquelle abhängig.

3. **Prozessüberwachung (min. 4x Eingang)**

(a) **elektrische Parameter (2x Eingang)**

Der Prozess kann in der Form der Plasmaleistungsmessung (siehe Kapitel 1.5.1 und B.3.3) erfolgen. Über einen Hochspannungsteiler kann, die an der Anordnung anliegende Spannung, zeitlich erfasst werden. Als zweites Signal wird die Spannung über einen Widerstand ermittelt. Aus diesem Spannungssignal kann der zeitliche Stromverlauf der Entladung bestimmt werden. Die so während des Prozesses gemessenen Signale werden über entsprechende Algorithmen im Steuerungscomputer ausgewertet und mit Sollwerten verglichen. Wenn notwendig, können die Messwerte mittels eines AD-Wandlers zuvor für den Steuerungscomputer aufbereitet werden.

Für eine Bewertung der Signale müssen im Wesentlichen zwei Zustände überwacht werden. Der erste ist der reguläre Zustand während des Prozesses. Hierfür muss die an der Anordnung anliegende Hochspannung eine zuvor definierte Amplitude und Frequenz er-

reichen. Weiterhin muss die aus der Hochspannung und dem Strom bestimmte mittlere Leistung innerhalb eines definierten Bereiches liegen. Sind diese Parameter erfüllt, so war der Prozess aus Sicht der Plasmaerzeugung erfolgreich.

Der zweite zu überprüfende Zustand definiert sich aus der Gerätesicherheit. Sollte es einen elektrischen Durchschlag im System geben, so sind die Anforderungen an den Behandlungsprozess nicht mehr gegeben. Zudem stellt dieser Zustand eine Gefährdung für weitere Systemkomponenten dar. Kommt es zu einem elektrischen Durchschlag, so erreicht die Hochspannung nicht mehr ihre maximale Amplitude. Zudem tritt ein sehr hoher elektrischer Strom auf. Tritt dieser Fall ein, so muss die Hochspannung unverzüglich abgeschaltet werden.

Die Werte für die Amplitude der Hochspannung und die der eingebrachten Leistung sollten im Rahmen einer guten Laborpraxis protokolliert werden

(b) relative Luftfeuchtigkeit (1x Eingang)

Wie zuvor beschrieben, wird die relative Luftfeuchtigkeit des Prozessgases, welches in das System gelangt, mittels eines Sensors gemessen und über Proportionalventile geregelt. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass der für den Prozess notwendige Wert nicht erreicht wird, was das Prozessergebnis beeinträchtigt. Aus diesem Grund muss der Wert der relativen Prozessgasfeuchtigkeit protokolliert werden.

(c) Gasfluss (1x Eingang)

Um sicher zu stellen, dass das Volumen innerhalb des Gehäuses vor und nach der Behandlung genügend oft ausgetauscht wird, muss der Gasfluss gemessen, mit einem Sollwert abgeglichen und protokolliert werden. Dies stellt zum einen die relative Luftfeuchtigkeit für den Prozess, als auch die notwendige Ausspülung der vom Plasma gebildeten Spezies nach dem Prozess sicher, bevor das Gehäuse geöffnet wird.

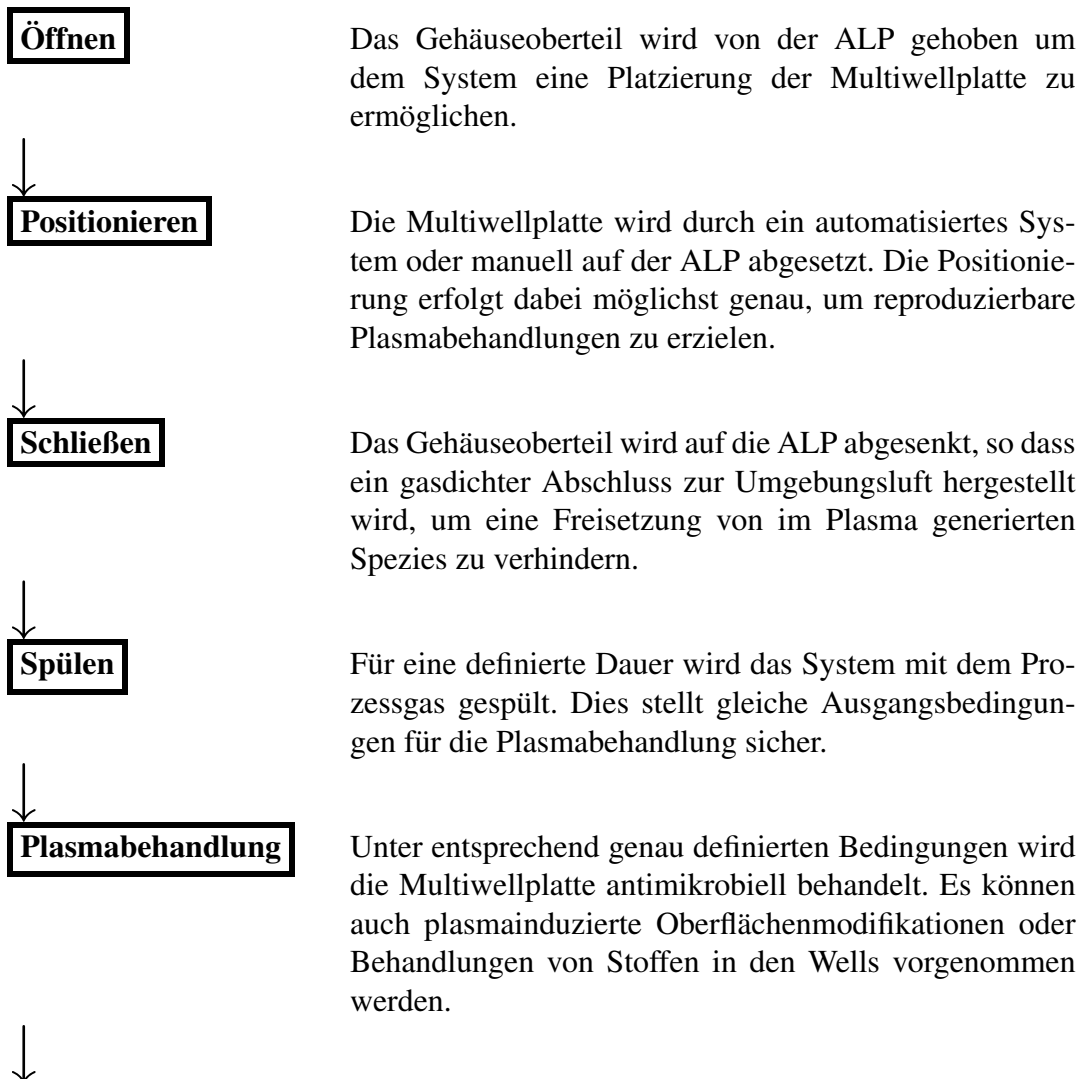
(d) Optional

Es können neben den zuvor aufgeführten elektrischen noch andere Parameter überwacht werden. Über Sensoren kann zum Beispiel die vom

Plasma emittierte Strahlung, die Temperatur am Substrat oder die Zusammensetzung des Prozessgases erfasst und für die Prozessbewertung herangezogen werden.

3.5 Prozessablaufplan

Der Prozessablauf zur Behandlung der Multititerplatten, in den zuvor beschriebenen DBE und Korona-DBE Systemen, erfolgt nach folgendem Schema:





Spülen

Dieser Spülvorgang dient der sicheren Entfernung von möglichen gesundheitsgefährdenden Stoffe (z.B. Stickoxide und Ozon) aus dem System.



Öffnen

Das Gehäuseoberteil wird von der ALP gehoben um das Entnehmen der Mikrotiterplatte zu ermöglichen.



Entnehmen

Die Multiwellplatte kann für weitere Behandlungen oder Verwendungen entnommen werden.

3.6 Elektrische Parameter der Anordnungen

Die elektrischen Eigenschaften der Plasmafinger und der Korona-DBE sind in Tabelle 3.1 für Standardbedingungen zusammenfassend aufgeführt. Sie wurden, wie in den Grundlagen beschrieben (siehe Kapitel B.3.3), aus den Lissajousfiguren C.2 und C.3 ermittelt. Die Systeme wurden, wenn für den Prozess eine definierte Luftfeuchtigkeit erforderlich war, für mindestens 30 s mit einem Gesamtgasfluss von mehr als $10 \frac{l}{min}$ gespült.

Tabelle 3.1: *Vergleich der elektrischen Eigenschaften von Plasmafingern und Korona-DBE; Die typische Plasmaleistung wurde aus der am häufigsten eingesetzten Frequenz und der verwendeten Plasma An-Zeit (25 %) errechnet. Zu berücksichtigen ist, dass ein voller Zyklus der Impulsspannungsquelle (siehe Kapitel B.2) sich immer aus einem positiven und negativen Impuls zusammensetzt.*

	Plasmafinger 16 gemessen / 96 rechnerisch	Korona-DBE 96 gemessen
C_d [pF]	118 / 708	17
C_g [pF]	92 / 552	12
Zyklusenergie $24 kV_{SS}$ [mJ]	4 / 24	1,3
typ. Frequenz [kHz]	2	20
typ. Plasmaleistung [W]	1,5 / 6	3,3

Es sind deutlich die kapazitiven Unterschiede der zwei Anordnungen zu erkennen. Um bei gleichen Parametern (Amplitude der Hochspannung, Plasma An-Zeit) eine von der Größenordnung mit den Plasmafingern vergleichbare mittlere Leistung ins Plasma einbringen zu können, wurde die Frequenz der Hochspannung auf 20 kHz erhöht. Die Werte für ein 96er Array von Plasmafingern wurden errechnet, da für die Versuche nur 16 Plasmafinger zur Verfügung standen.

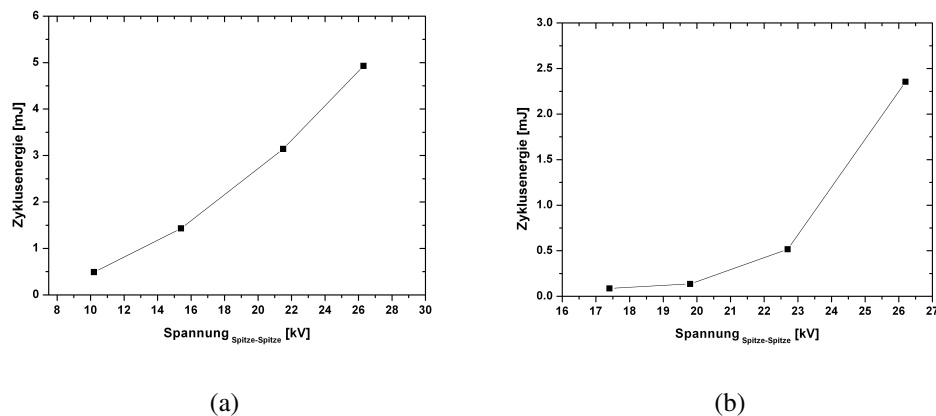


Abbildung 3.6: Zyklusenergien für a.) 16 Plasmafinger und b.) 96er Korona-DBE in Abhängigkeit von der angelegten Hochspannung bei 20 % relativer Luftfeuchtigkeit

Aus Abbildung 3.6 wird, für den untersuchten Bereich, ein überproportionales Ansteigen der Zyklusenergie mit der Amplitude der Hochspannung deutlich. Dies entspricht dem von Ouyang et al. [54] für Oberflächenentladungen gezeigten Verhalten (siehe Gleichung 1.10 in Kapitel 1.3.1). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der genauen Regelung der Hochspannungsversorgung. Es ermöglicht jedoch auch eine starke Erhöhung der Plasmaleistung, wenn dies für den erwünschten Prozess notwendig ist.

Plasmafinger

Aus der Literatur sind keine Untersuchungen an konvex gebogenen Oberflächen-DBE Elektroden bekannt. Die Ausbreitung des Plasmas, in Abhängigkeit der Polarität, wurde nur auf ebenen Elektroden beschrieben (z.B. [51]). Um sicher zu

stellen, dass sich das Plasma auf der gesamten Oberfläche der Plasmafingers ausbreitet, wurden ICCD Aufnahmen von der Mantelfläche gemacht. Abbildung 3.7 b.)-d.) zeigt die Ausbreitungsmuster des Plasmas auf der Mantelfläche eines Plasmafingers an der in a.) gekennzeichneten Stelle.

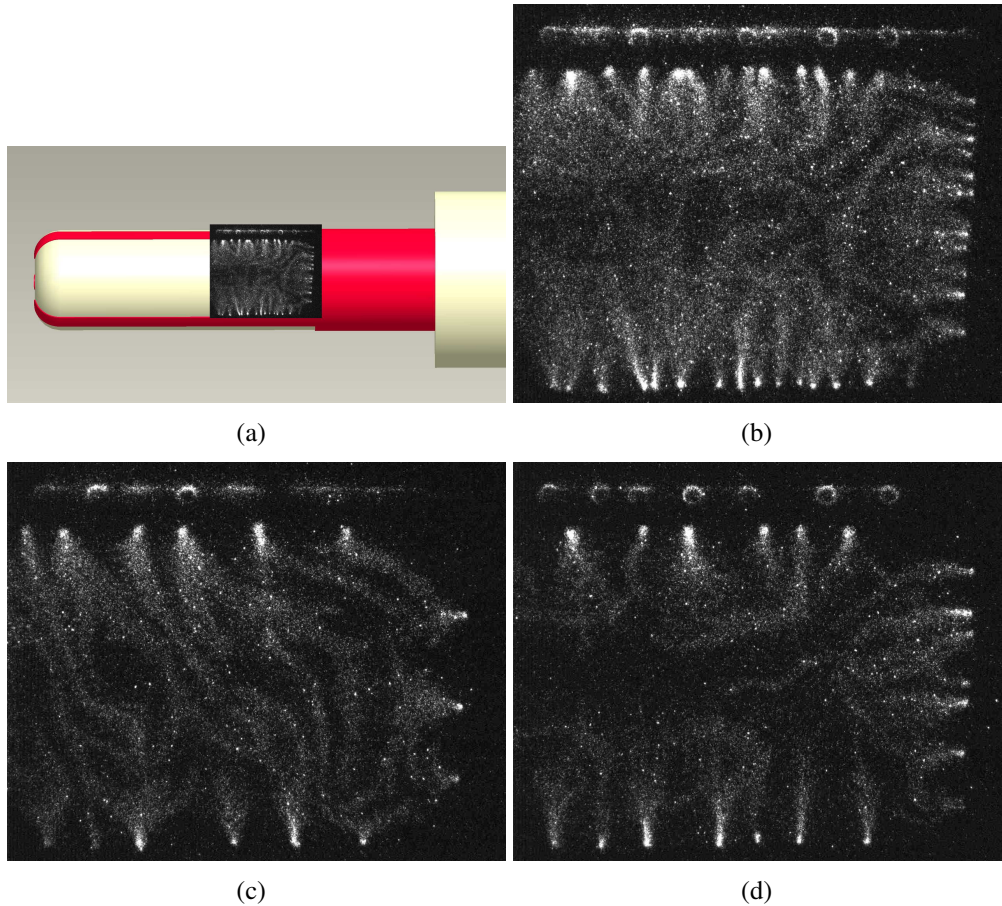


Abbildung 3.7: ICCD Aufnahmen eines Plasmafingers mit einer Frequenz von 2 kHz und einer Amplitude von 12 kV : (a) Region der Aufnahme, (b) bipolar 1 ms , (c) positiv $250\text{ }\mu\text{s}$, (d) negativ $250\text{ }\mu\text{s}$

Für unipolare positive und negative Pulse sind die Ausbreitungsmuster jeweils für einen Einzelpuls dargestellt. Es sind deutlich die in der Literatur beschriebenen Unterschiede zu erkennen. Für positive Pulse bilden sich über der gesamten Fläche diffuse Filamente aus, die in einzelnen Ansatzpunkten an den Elektroden enden. Die Ansatzpunkte können auch durch geometrisch exponierte Stellen an

den Elektroden bedingt werden. Diese können zum Teil durch den Herstellungsprozess der Elektroden verursacht sein. Für negative Pulse scheinen die Muster von Ansatzpunkten an den Elektroden auszugehen. In diesem Fall gibt es in der Mitte zwischen den Elektrodenstreifen einen Bereich, in dem die Filamente nicht miteinander verbunden sind. In den Ecken ist dies ebenfalls zu erkennen. Der nicht von den Filamenten bedeckte Bereich sieht wie ein auf der Seite liegendes Y aus. Die Aufnahme des bipolaren Falls zeigt die Summe eines positiven und negativen Pulses. Da alle Versuche im bipolaren Betriebsmodus durchgeführt wurden, kann von einer gleichmäßigen Ausbreitung des Plasmas auf der Oberfläche und somit von einer gleichmäßigen Behandlung der Wells ausgegangen werden.

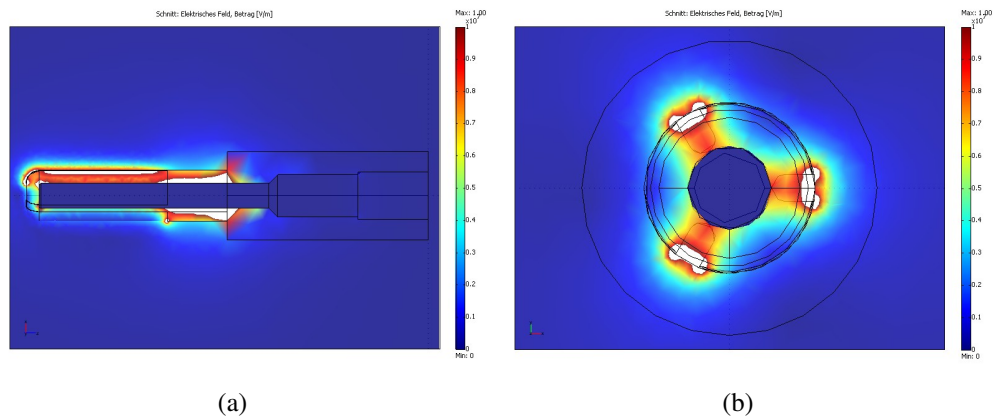


Abbildung 3.8: 3D Simulation des statischen elektrischen Feldes der Plasmafingers bei 12 kV im Längsschnitt (a) und Querschnitt (b), die Innenelektrode ist geerdet

Zur weiteren Charakterisierung und Überprüfung der geometrischen Auslegung der Plasmafingers, wurde mit Comsol Multiphysics das statische elektrische Feld simuliert (siehe Abbildung 3.8). Dies erfolgte als dreidimensionales Modell eines einzelnen Plasmafingers. Die äußere Elektrode wurde mit einem Potenzial von 12 kV beaufschlagt, wohingegen die Innenelektrode geerdet war. Wie in Abbildung 3.8 erkennbar, zeigt der Betrag des elektrischen Feldes auf der Mantelfläche eine vergleichbare Ausprägung wie im Bereich des unteren Ende. Dies resultiert aus der Verrundung der Kante zwischen Mantelfläche und Stirnseite und der damit verbundenen gleichmäßigen Wandstärke zwischen Innen- und Außenelektrode. Die in Abbildung 3.8 weiß dargestellten Bereiche sind Punkte, an denen der Be-

trag des elektrischen Feldes Werte größer als $10 \frac{kV}{mm}$ annimmt. Ausgehend von den Elektrodenstreifen, nimmt der Betrag des elektrischen Feldes auf der Außenseite des Fingers stetig ab und erreicht direkt zwischen zwei Elektrodenstreifen einen Wert von ca. $2 \frac{kV}{mm}$. Dieser Wert liegt etwas unterhalb der in Kapitel 1.3.2 beschriebenen Zündfeldstärke. Wie in Abbildung 3.7c.) zu erkennen ist, breiten sich für negative und positive Hochspannungsimpulse nur sehr wenige und schwächere Plasmastrukturen, mittig zwischen zwei Elektrodenstreifen, aus. Die Intensität der Plasmastrukturen nimmt ausgehend von der Außenelektrode zur Mitte hin ab. Dies steht in guter Korrelation mit der Simulation des elektrischen Feldes. Weiterhin lässt sich in Abbildung 3.8 eine starke Reduktion des elektrischen Feldes am Übergang von $5 mm$ zu $8,8 mm$ erkennen, wodurch die Ausbreitung des Plasmas in Richtung des oberen Endes verhindert wird. Dies verhindert einen durch das Plasma erzeugten Kurzschluss zwischen Innen- und Außenelektrode.

Korona-DBE

Die Anordnung der Elektroden der Korona-DBE ist deutlich von denen der Plasmafinger verschieden. In Abbildung 3.9 ist eine zweidimensionale Simulation des statischen elektrischen Feldes einer Korona-DBE bei $12 kV$ gezeigt. Die Kodierung der Farbskala ist so gewählt, dass alle Feldstärken größer als $3 \frac{kV}{mm}$ weiß dargestellt sind, was der Zündfeldstärke entspricht. Zu erkennen ist, dass nur in einem sehr kleinen Bereich, mit einem Radius von $0,2 mm$ um die Spitze herum, die Feldstärke zur Zündung eines Plasmas in Luft bei Atmosphärendruck (siehe Kapitel 1.3.2) auftritt. Ein Bereich dieser Größe ist auch in der ICCD Aufnahme in Abbildung 3.10b zu erkennen. Dieser definiert sich über den Radius der Spitze, die maximale Amplitude der Hochspannung und die Zündfeldstärke. Die Spitzen der Nadelelektroden wurden durch Schneiden mit einem Seitenschneider bei gleichzeitiger Zugbewegung erzeugt. Dadurch werden sehr kleine Spitzenradien erzielt. Errechnet man nach Gleichung 1.17 den Radius der Spitze mit einem Wert von $12 kV$ für V_0 , so erhält man einen Radius von $10 \mu m$.

Abbildung 3.10 zeigt jedoch noch weitere Plasmastrukturen. Ausgehend von der Spitze breiten sich zum Boden und den Wänden der Multiwellplatte Streamer aus. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, können sich Streamer in einem abnehmenden

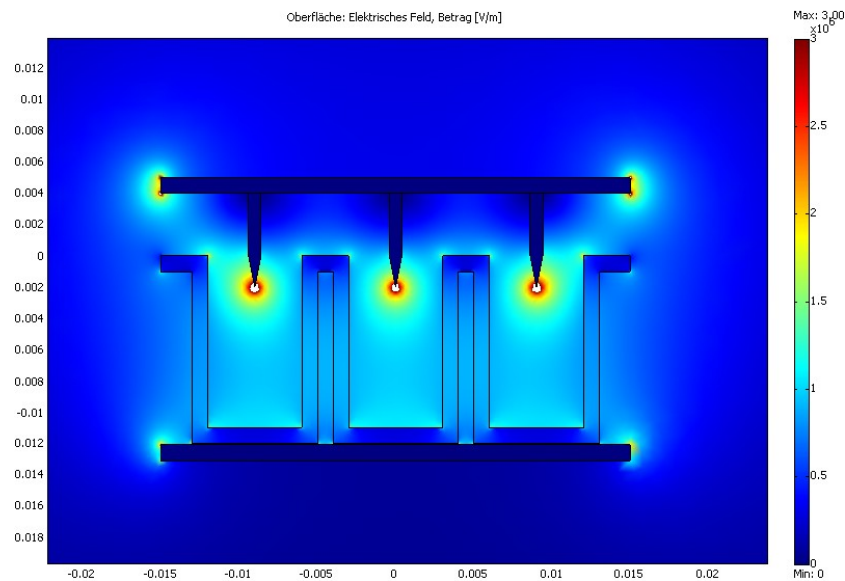


Abbildung 3.9: 2D Simulation des statischen elektrischen Feldes der Corona-DBE bei 12 kV

elektrischen Feld auch unterhalb der Zündfeldstärke ausbreiten, wenn die erste Ableitung des Hochspannungssignals einen genügend großen Wert annimmt. In der Abbildung 3.9 ist der Gradient im Betrag der elektrischen Feldstärke zwischen der Nadelelektrode und dem Boden sehr gut zu erkennen. Die notwendige Überspannung und der steile Anstieg der Hochspannung wurden durch die Verwendung der Impulsspannungsquelle erzielt (siehe Abbildung B.3).

Wie in Abbildung 3.10c zu erkennen, breiten sich die Streamer auf dem Boden der Wells aus. Diese Abbildung zeigt die Summe von jeweils fünf positiven und negativen Impulsen und lässt schon eine fast vollständige Bedeckung des Bodens durch die Fußpunkte der Streamer erkennen. Dies ist eine notwendige Bedingung für eine gleichmäßige Behandlung der Wells. Die Ausbreitung der Streamer zu den Wänden hin erfolgt sowohl direkt an der Nadelelektrode (Abb. 3.10b) als auch in der unteren Hälfte des Wells (Abb. 3.10c).

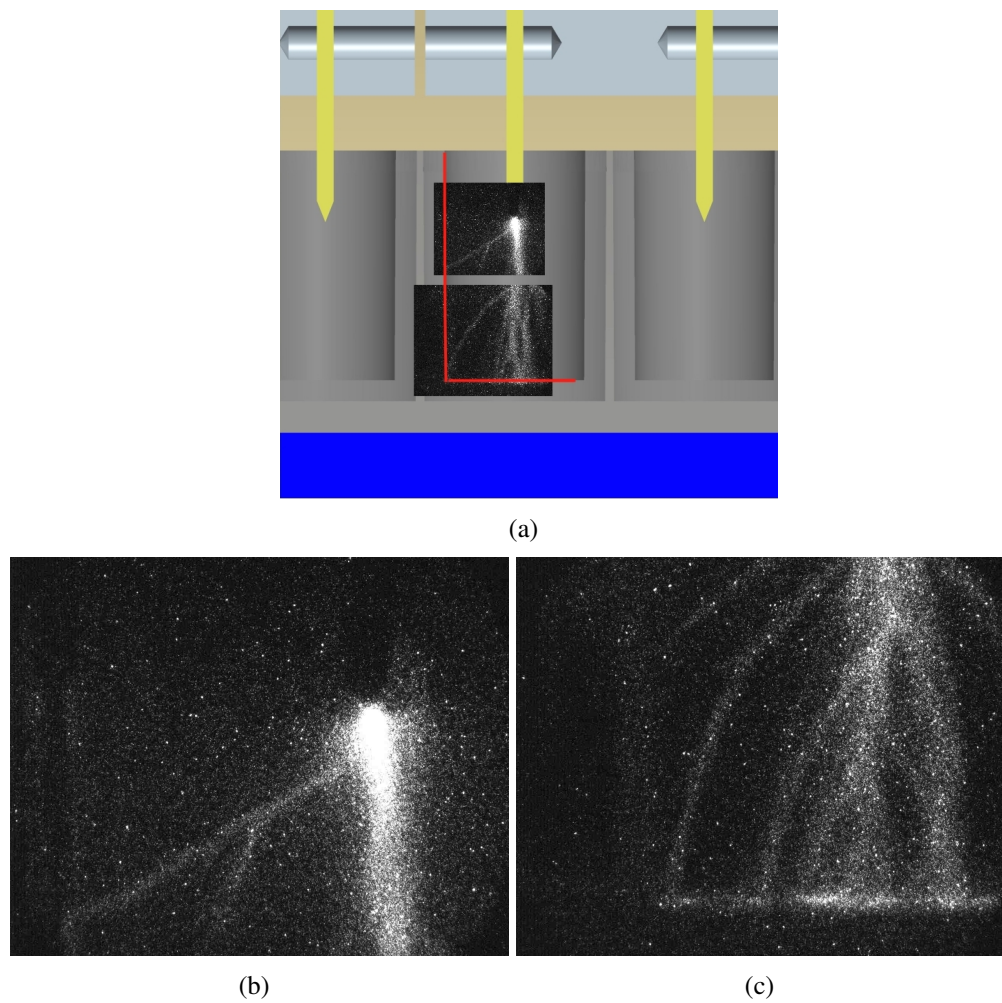


Abbildung 3.10: ICCD Aufnahmen einer Korona-DBE mit einer Frequenz von 10 kHz und einer Amplitude von 12 kV : (a) Bereiche der Aufnahmen, (b) bipolar 1 ms im Bereich der Spitze, (c) bipolar 1 ms am Boden des Wells

3.7 Verifizierung der antimikrobiellen Wirkung

Plasmafinger

Basierend auf der Ähnlichkeit mit den Elektroden der zweidimensionalen Oberflächen-DBE und den für ebene Substrate gewonnenen Erkenntnissen, wurden alle Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung der Plasmafinger bei 70 % relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Der Innendurchmesser der Wells betrug ca. $6,0\text{ mm}$ am Boden und $6,6\text{ mm}$ am oberen Rand. Da die Plasmafinger einen Durchmesser von 5 mm besitzen, beträgt der Abstand zwischen einem axial im Well positioniertem Plasmafinger und der Wand des Wells zwischen $0,5\text{ mm}$ und $0,8\text{ mm}$. Dies entspricht im Mittel dem Abstand der Versuche an ebenen Substraten. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen jeweils die Mittelwerte sowie minimale und maximalen Werte der in den Wells verbliebenen koloniebildenden Einheiten. Die Ausgangskontaminationen pro Well wurden so gewählt, wie sie auch auf den ebenen Teststreifen verwendet wurden.

Wie in Abbildung 3.11 zu erkennen ist, nimmt die Anzahl der koloniebildenden Einheiten mit der Behandlungszeit ab. Dies geht mit den in Kapitel 2.3 vorgestellten Ergebnissen konform. Nach einer Behandlungszeit von 2 min liegt der Wert unterhalb der Nachweisgrenze einer koloniebildenden Einheit. Schon nach 20 s sind mehr als zwei Log-Stufen an Bakteriensporen abgetötet, was den grundlegenden Anforderungen an das System genügt.

Abbildungen 3.12 und 3.13 zeigen den Einfluss verschiedener Variationen der Plasmaleistung auf die keimreduzierende Wirkung. Eine Erhöhung der Plasma An-Zeit (siehe Abbildung 3.12) führt zu einer Reduktion der koloniebildenden Einheit in den Wells nach der Plasmabehandlung. Eine Verdopplung der Plasma An-Zeit bei einer Behandlungszeit von 60 s resultiert in einer um eine Log-Stufe höheren Keimreduktion. Die Plasmaleistung ist linear mit der Plasma An-Zeit verbunden. Wie schon in den Voruntersuchungen herausgestellt wurde, trägt das Hydroxylradikal maßgeblich zur Keimreduktion bei. Wie von Ono und Oda [75] gezeigt wurde, beträgt die Lebensdauer der Hydroxylradikale deutlich unter $100\text{ }\mu\text{s}$. Vergleicht man die Lebensdauer der durch Elektronenstoßprozesse erzeugten Hydroxylradikale mit den verwendeten Plasma Aus-Zeiten, so wird der große Unter-

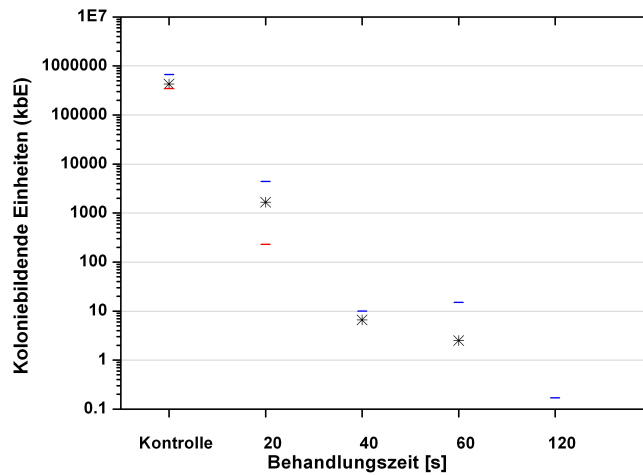


Abbildung 3.11: *Koloniebildende Einheiten in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, relative Luftfeuchtigkeit 70 %, Generatorspannung 12 kV, Plasma-An-Zeit 20 %*

schied der Zeitskalen deutlich. Es kann davon ausgegangen werden, dass über große Bereiche der Plasma Aus-Zeit keine Hydroxylradikale vorhanden sind. Durch eine Erhöhung der Plasma An-Zeit wird auch die mittlere Konzentration der Hydroxylradikale erhöht und damit auch die Wirkung auf die Mikroorganismen.

Wie zuvor gezeigt, ist die in das Plasma eingebrachte Leistung in höherer Potenz von der Amplitude der Hochspannung abhängig. Ausgehend von Abbildung 3.6a führt eine Erhöhung der Amplitude (Spitze-Spitze) von 20 kV auf 24 kV zu einem Anstieg der Zyklusenergie um 45 %. Abbildung 3.13 zeigt die koloniebildenden Einheiten in Abhängigkeit von der Hochspannungsamplitude. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen 10 kV auf 12 kV erkennbar. Über die Amplitude der Hochspannung werden das lokale elektrische Feld und damit auch die reduzierte elektrische Feldstärke verändert. Dies führt auch zu einer Veränderung der Elektronen-Energie-Verteilungsfunktion. Eine Erhöhung des Energieinhaltes des Plasmas führt zu einem Anstieg der durch direkte Elektronenstöße gebildeten Spezies. Dieser Sachverhalt zeigt, wie sensitiv der antimikrobielle Effekt der vorlie-

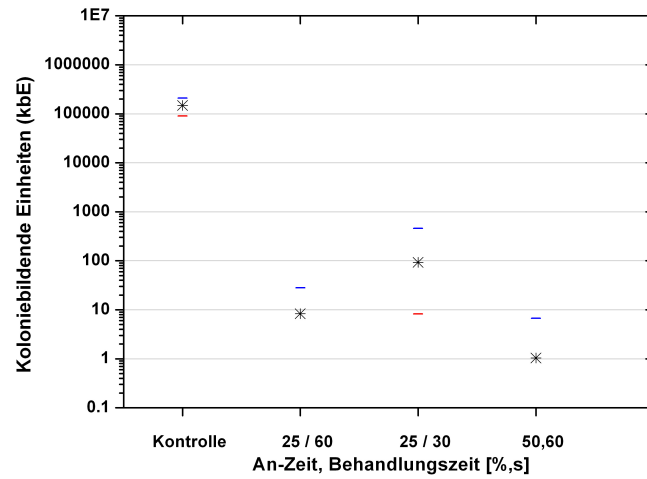


Abbildung 3.12: *Koloniebildende Einheiten in Abhängigkeit von der Plasma-An-Zeit und der Behandlungszeit, relative Luftfeuchtigkeit 70 %, Generatorspannung 12 kV*

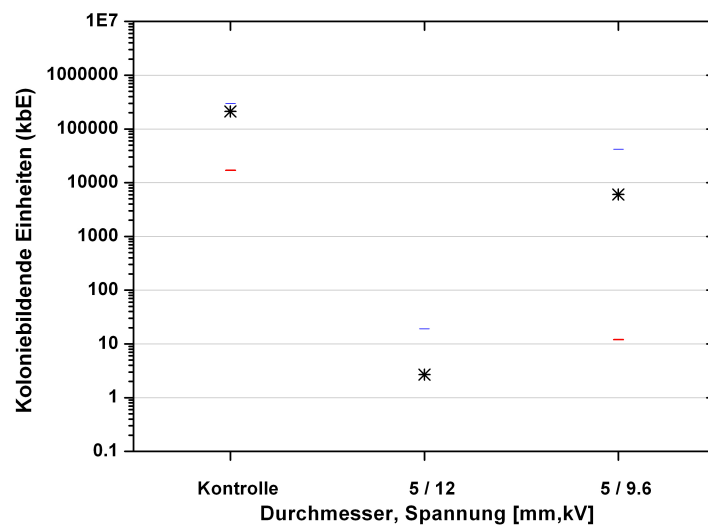


Abbildung 3.13: *Koloniebildende Einheiten in Abhängigkeit von der Versorgungsspannung, relative Luftfeuchtigkeit 70 %, Behandlungsdauer 60 s*

genden Elektrodenkonfiguration von der Amplitude der Hochspannung abhängig ist.

Korona-DBE

Da die Elektrodenkonfiguration der Plasmafinger deutlich verschieden von der Korona-DBE ist, wurde zunächst der Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf die antimikrobielle Wirkung untersucht. Anders als im Fall der Plasmafinger, bildet sich hier das Plasma bis auf die Oberflächen der Wells aus (siehe Abbildung 3.10). Da die Zyklusenergie (siehe Tabelle 3.1) vergleichsweise gering ist, wurde eine Wiederholfrequenz von 20 kHz gewählt. Damit liegt die hier verwendete Zyklusenergie immer noch deutlich unter der für die Plasmafinger.

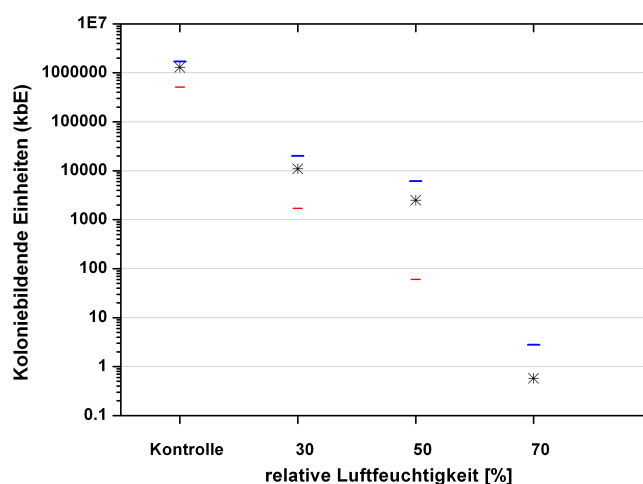


Abbildung 3.14: *Koloniebildende Einheiten in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit 70 %, Generatorspannung 12 kV, Behandlungszeit 1 min, Wiederholfrequenz 20 kHz*

Wie auch in den Voruntersuchungen, ist hier die relative Luftfeuchtigkeit von großer Bedeutung (vergleiche Abbildungen 2.9 und 3.14). Dies zeigt erneut den Einfluss der aus der Luftfeuchtigkeit gebildeten Hydroxylradikale. In Abbildung 3.14 ist zu erkennen, dass relative Luftfeuchtigkeiten bis 50 % nur geringe Effekte

zeigen. Wird dieser Schwellwert überschritten, steigt die antimikrobielle Wirksamkeit stark an.

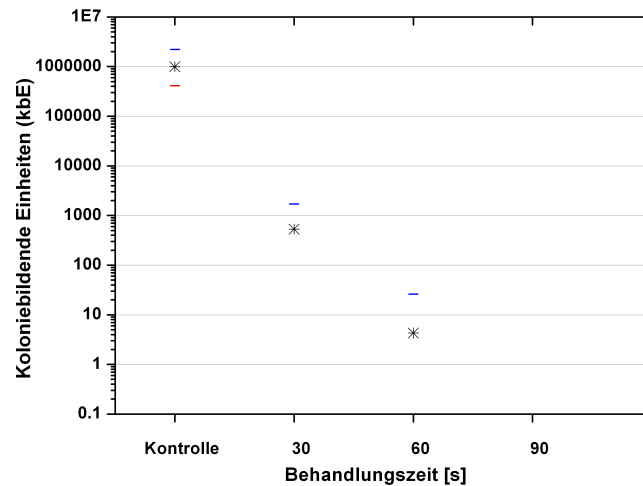


Abbildung 3.15: *Koloniebildende Einheiten in Abhängigkeit von der Behandlungszeit, relative Luftfeuchtigkeit 70 %, Generatorspannung 12 kV, Wiederholfrequenz 20 kHz*

Der Vergleich zum Einfluss der Behandlungszeiten bei Plasmafingern und Korona-DBE (vergleiche Abbildung 3.15 und 3.11) zeigt eine vergleichbare Abtötungskinetik. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Plasmaleistung im Fall der Plasmafinger fast doppelt so hoch ist. Die dennoch vergleichbaren Effekte lassen sich durch die Ausbreitung des Plasmas bis auf die Oberflächen der Wells begründen. Da die Hydroxylradikale durch direkten Elektronenstoß aus Wassermolekülen gebildet werden und auf Grund der kurzen Lebensdauer nur eine sehr geringe Reichweite besitzen, weist die Korona-DBE eine größere Effizienz als die Plasmafinger auf. Die erforderliche Keimreduktion von mehr als zwei Log-Stufen ist, unter Verwendung der Korona-DBE bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 %, schon nach 30 s Behandlungszeit erreicht.

Wie schon beschrieben, ist die Zyklusenergie für ein 96er Array der Korona-DBE sehr gering. Der Einfluss der Wiederholfrequenz auf die Abtötung der Bakteri-

ensporen ist in Abbildung C.4 dargestellt. Ein Ansteigen der Wiederholffrequenz bedingt eine Zunahme der Plasmaleistung. Dies führt ebenfalls, wie für ebene Substrate und für Plasmafinger demonstriert, zu einem Ansteigen der antimikrobiellen Wirkung.

3.8 Zellbiologische Untersuchungen

Eine antimikrobielle Behandlung der Multiwellplatten, sowohl mit den Plasmafingern als auch mit der Korona-DBE, unter bestimmten Parametern, wie zuvor gezeigt, möglich. Auf Grund des einfacheren Aufbaus und der direkten Ausbreitung des Plasmas auf der Oberfläche der Wells, wurden die zellbiologischen Eigenschaften, der hier behandelten Zellkulturplatten, am Beispiel der Korona-DBE untersucht. Hierzu wurden Zellkulturplatten mit Nunclon® Oberflächen der Firma Nunc verwendet. Die Quantifizierung der Oberflächeneigenschaften wurde entsprechend des in Kapitel B.6 beschriebenen Protokolls mit adhärenen HaCaT Zellen durchgeführt. Höhere Absorptionswerte entsprechen einer höheren Zellzahl oder Zellvitalität. Wenn nicht weiter erklärt, sind in den Diagrammen zur Darstellung der Zellvitalität die Daten als Box-Whisker-Plot, bestehend aus oberem und unterem Quartil sowie dem Mittelwert der Messreihe, dargestellt. Der untere sowie der obere Whisker stellen die Minimal- und Maximalwerte der Messreihe dar.

Abbildung 3.16 zeigt die Absorptionssignale aus dem XTT Test in Abhängigkeit von der Behandlungszeit für zwei Versuchstage. Für vergleichbare Werte der Kontrollen beider Versuchstage, liegen die Mittelwerte der plasmabehandelten Multiwellplatten, für gleiche Prozessbedingungen, in Abbildung 3.16a leicht oberhalb und in Abbildung 3.16b etwas unterhalb der Kontrolle. Am 15.11.2009 zeigt sich ein klarer Trend der Messwerte in Abhängigkeit von der Behandlungszeit. Dabei steigen die Mittelwerte mit zunehmender Behandlungszeit an und erreichen für 75 s den Wert der Kontrolle.

Für die gleichen Versuchstage wurden Untersuchungen zum Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit während der Plasmabehandlung auf die zellbiologischen Eigenschaften der Multiwellplatten durchgeführt. Es zeigen sich nur geringfügige Abweichungen gegenüber den Kontrollen. Dennoch ergibt sich eine vergleichba-

re Tendenz, so dass die Mittelwerte für den 15.11.2009 unterhalb und für den 07.11.2009 oberhalb der Kontrolle liegen. Die Multiwellplatten wurden unmittelbar nach der Plasmabehandlung aus dem System entnommen und der freien Raumluft ausgesetzt. Es wurde vermutet, dass die Luftfeuchtigkeit der Raumluft nach der Plasmabehandlung einen Einfluss auf die Zellvitalität und somit auf das Absorptionssignal des XTT Test hat. Daher wurden Multiwellplatten unter Standardbedingungen behandelt und direkt nach der Behandlung für 10 *min* einer definierten Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Hier ist erkennbar, dass mit abnehmender relativer Luftfeuchtigkeit das Absorptionssignal zunimmt. Die Probe, welche direkt nach der Behandlung der Raumluft bei 28 % relativer Luftfeuchtigkeit ausgesetzt wurde, fügt sich in den Verlauf der Proben, welche unter definierten Bedingungen gelagert wurden, ein. Somit wird das Ergebniss auch durch die Luftfeuchtigkeit der Umgebungsluft beeinflusst.

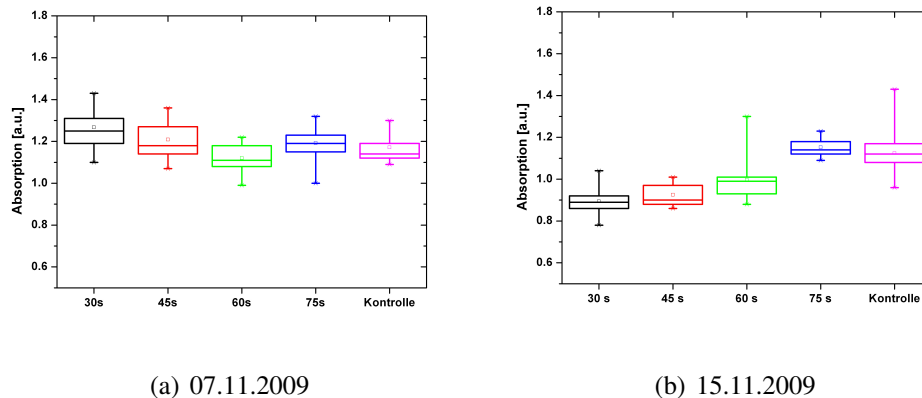


Abbildung 3.16: XTT Absorptionssignal in Abhängigkeit von der Behandlungszeit; Nunclon[®] Oberfläche, relative Luftfeuchtigkeit 70 %, Spannung 12 kV, Plasma An-Zeit 25 %; Box-Whisker-Plot: Quartile/Mittelwert/Min/Max

Die Plasmaleistung hat einen Einfluss auf die keimtötende Wirkung des Plasmas. Abbildung C.5 zeigt den Einfluss der Wiederholfrequenz auf die Zellvitalität. Es ist zu erkennen, dass für Frequenzen bis zu 10 kHz, Absorptionswerte oberhalb der Kontrolle auftreten. Eine eindeutige Erklärung dafür kann aus den vorliegenden Untersuchungen nicht gegeben werden, da sowohl die chemi-

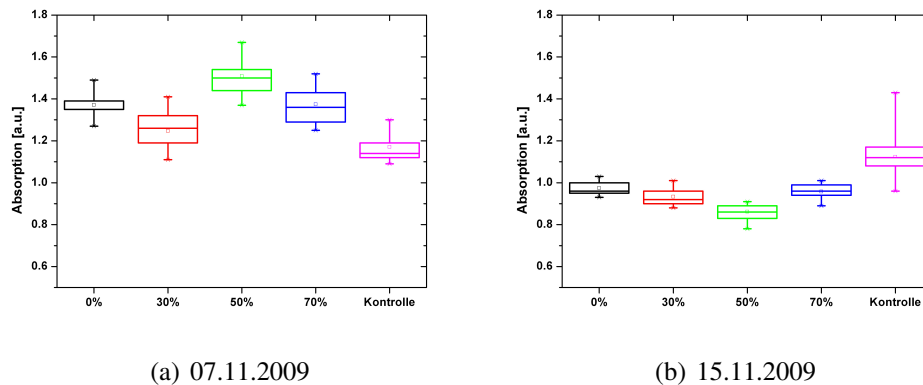


Abbildung 3.17: XTT Absorptionssignal in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit des Prozessgases; Nunclon[®] Oberfläche, Spannung 12 kV, Plasma An-Zeit 25 %, Behandlungszeit 60 s; Box-Whisker-Plot: Quartile/Mittelwert/Min/Max

schen als auch morphologischen Eigenschaften der Polystyroloberfläche, durch die Plasmabehandlung verändert werden und sich in unterschiedlicher Weise auf die Zelladhäsion und das Zellwachstum auswirken. Wiederhol frequenzen, bei denen höhere Keimreduktionen erzielt wurden, zeigen mit der Kontrolle vergleichbare Absorptionswerte. Eine Erklärungsansatz könnte sein, dass die für die Zelladhäsion günstigen chemischen Modifikationen den Abtrag der Oberfläche durch das Plasma überwiegen und dadurch höhere Zellvitalitäten auftreten.

Kommerziell erhältliche Zellkulturplatten sind, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, plasmabehandelt. Die Parameter der Plasmabehandlungen nativer Polystyrolprodukte werden dabei von den Herstellern nicht genauer spezifiziert. Es wurde anhand unbehandelter Multiwellplatten für die chemische Diagnostik und ohne Zellkultureigenschaften geprüft, in wieweit sie nach einer Plasmabehandlung unter Standardbedingungen für die Zellkultur geeignet sind. Zusätzlich wurden sie nach der Plasmabehandlung für 10 min in trockener Luft gelagert. Die Ergebnisse sind in Abbildung C.6 dargestellt. Für unbehandelte Multiwellplatten dieser Sorte konnte keine Absorption gemessen werden. Behandlungen ab einer Behandlungsdauer von 30 s zeigen mit einer Nunclon[®] Oberfläche vergleichbare Werte. Für 75 s ist jedoch wieder ein leichtes Absinken des Gleichen zu beobachten. Native

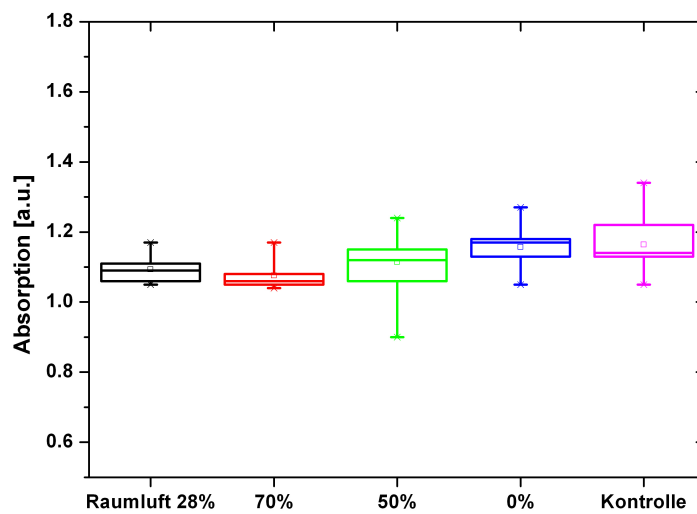
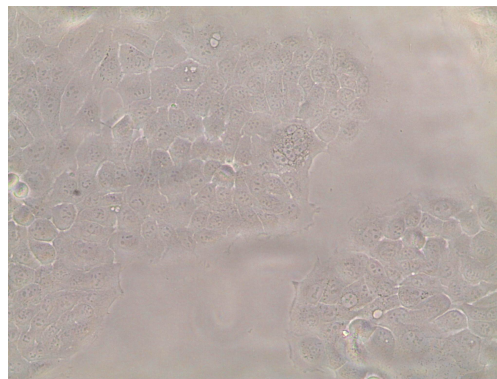
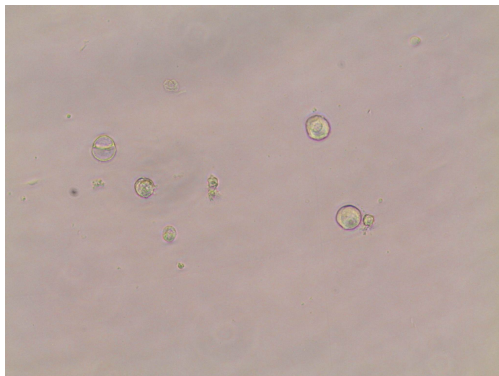


Abbildung 3.18: XTT Absorptionssignal in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit der Umgebungsluft nach der Behandlung, Raumluftprobe wurde direkt nach der Behandlung der freien Raumluft ausgesetzt, die anderen Proben wurden für weitere 10 min einer kontrollierten Atmosphäre ausgesetzt; Nunclon[®] Oberfläche, relative Luftfeuchtigkeit des Prozessgases 70 %, Spannung 12 kV, Plasma An-Zeit 25 %, Behandlungszeit 60 s; Box-Whisker-Plot: Quartile/Mittelwert/Min/Max

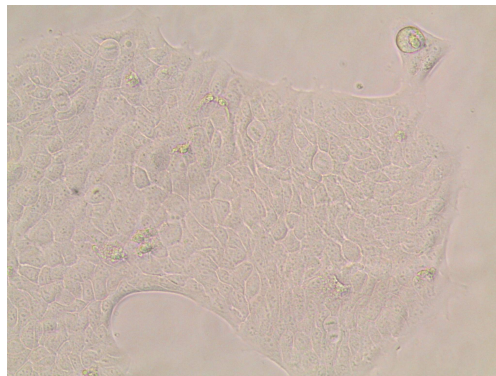
Polystyroloberflächen können durch das hier verwendete keimreduzierende Plasma mit für Zellkulturversuche geeigneten Oberflächen ausgestattet werden, die mit kommerziell erwerbbaaren Zellkulturplatten vergleichbar sind.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.19: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HaCaT Zellen nach 48 Stunden in 96er Multiwellplatten (a) Zellkulturplatte mit Nunclon® Oberfläche, (b) native Diagnostikplatte Rotilabo®-Mikrotest-Platte, (c) Diagnostikplatte Rotilabo®-Mikrotest-Platte nach 60 s Plasmabehandlung unter Standardbedingungen bei 70 % relativer Luftfeuchtigkeit

Weiterhin wurde die Ausbreitung der Zellen auf der Oberfläche nach 48 Stunden mittels durchlichtmikroskopischer Aufnahmen beurteilt. Abbildung 3.19a zeigt das Zellwachstum auf einer Nunclon® Oberfläche. Plasmabehandelte Zellkulturplatten zeigten eine, mit der Kontrolle, vergleichbare Ausbreitung der HaCaT Zellen. In Abbildung 3.19b und c ist das Zellwachstum auf einer unbehandelten (b)

und plasmabehandelten (c) Rotilabo[®]-Mikrotest-Platte gezeigt. Während auf der nativen Rotilabo[®]-Mikrotest-Platte keine adhärenen Zellen zu erkennen sind, ist die plasmabehandelte Platte mit der Kontrollplatte der Firma Nunc vergleichbar. In Zusammenarbeit mit dem *Center for Life Science Automation (celisca)* wurden weitere Zellkulturversuche an plasmabehandelten Multiwellplatten durchgeführt [118]. Zellkulturplatten (Sarstedt) und Zellkulturplatten mit Poly-D-lysin oder Kollagen Typ I Beschichtung (Greiner bio-one) wurden plasmabehandelt und anschließend wurden in ihnen HeLa, CHO, HEK Zellen kultiviert. Mittels einem EZ4U Assay, einem dem XTT Assay ähnlichen Test, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Zellkulturplatten gefunden werden. Auch die Variation der Behandlungszeit ($1/2 \text{ min}$) und der Plasma An-Zeit (13/25 %) erbrachte keine signifikanten Unterschiede zur korrespondierenden unbehandelten Zellkulturplatte. Um unterschiedliche Charakteristika im Zellwachstum auszuschließen, wurden lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Wie schon in den Vitalitätsassays konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen plasmabehandelten und unbehandelten Zellkulturplatten bestimmt werden (siehe Abbildung 3.20 a-d).

Weiterhin wurden Multititerplatten behandelt, die für zellfreie Assays wie Enzymtest verwendet werden. Für die drei verwendeten Zelllinien konnte eine deutliche Steigerung des Zellwachstums beobachtet werden (siehe Abbildung 3.20 e und f). Dies zeigt, dass nicht nur Mikroorganismen abgetötet, sondern auch für die Zellkultur geeignete Oberflächeneigenschaften erzeugt werden können.

Die in Zusammenarbeit mit *celisca* [118] gewonnenen Erkenntnisse bestätigen in vollem Umfang die zuvor beschriebenen Untersuchungen mit der HaCaT Zellenlinie.

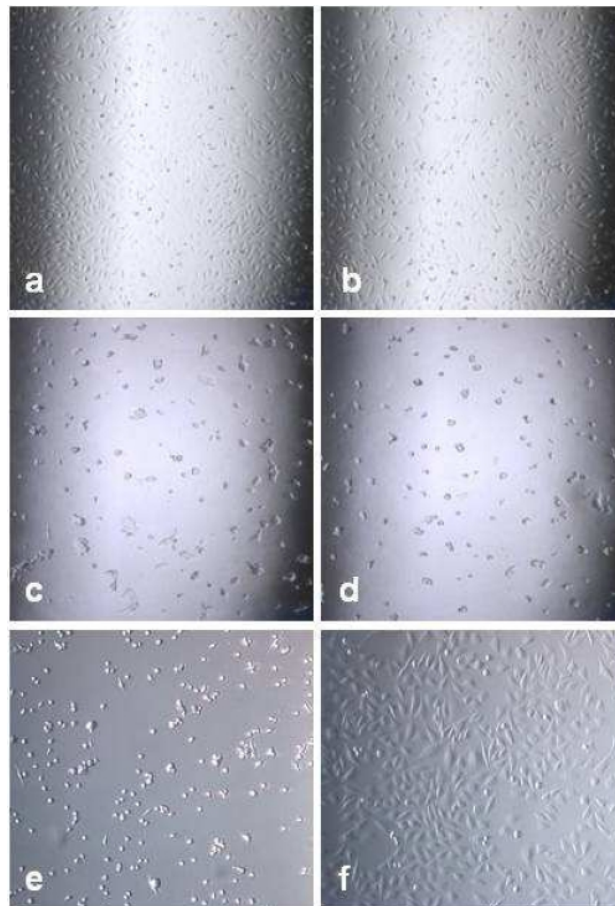


Abbildung 3.20: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrast, 40-fach (HeLa, HEK), 100-fach(CHO): HeLa (Poly-D-lysine; a,b), HEK (Kollagen Typ I; c,d), CHO (natives Polystyrol; e,f) nach 24 Stunden ohne Plasmabehandlung (a,c,e) und mit Plasmabehandlung (b,d,f)

Kapitel 4

Zusammenfassung - Summary

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Plasmasystems zur Keimreduktion von 96er Multiwellplatten. Es sollten alle Wells einer Platte gleichzeitig, bei Atmosphärendruck in Luft und mit einer Taktzeit von weniger als zwei Minuten behandelt werden. Die Plasmabehandlung sollte eine Reduktion der Bakteriensporen um mindestens zwei Größenordnungen, bei gleichzeitigem Erhalt der Zellkultureigenschaften, erreichen.

Erreicht wurden folgende Ziele:

- In Voruntersuchungen wurden an zweidimensionalen Substraten grundlegende Erfahrungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von dielektrisch behinderte Oberflächenentladungen in Luft gesammelt. Es wurde eine Reduktion von Bakteriensporen erzielt, die von der relativen Luftfeuchtigkeit des Prozessgases abhängig war.
- Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen haben einen deutlichen Abtrag der Sporen, durch das Plasma ergeben. Die Untersuchungen wurden erstmalig an den gleichen Sporen vor und nach der Plasmabehandlung durchgeführt. Die Abtragsrate nahm mit steigender relativer Luftfeuchtigkeit zu.
- Die aus den Voruntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse wurden in zwei Systeme zur Behandlung von 96er Multiwellplatten umgesetzt.
- Alle in den Voruntersuchungen erhaltenen Ergebnisse behalten auch bei der Behandlung von Wellplatten ihre Gültigkeit.

- Zellkulturuntersuchungen haben keine signifikanten Veränderungen der Zellkultureigenschaften der Multiwellplatten, gegenüber unbehandelten Platten, ergeben.

Um diese Ziele zu erreichen waren wegen unzureichender Informationen aus der Literatur, zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Luftplasmen, eine Reihe von Voruntersuchungen notwendig. Als Plasmaquelle wurde eine dielektrisch behinderte Oberflächenentladung verwendet. In Voruntersuchungen wurden an zweidimensionalen Substraten grundlegende Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit und Veränderung der Polystyroloberflächen durchgeführt.

Für einen Abstand zwischen Elektrode und den ebenen Substraten von $0,6\text{ mm}$ war eine Reduktion von mehr als vier Log-Stufen an Bakteriensporen innerhalb von $2,5\text{ min}$ möglich. Der Erfolg der Behandlung ist stark von der relativen Luftfeuchtigkeit des Prozessgases abhängig. Ein Ansteigen der relativen Luftfeuchtigkeit führt zu einer verstärkten Abtötung der Mikroorganismen. Um Aussagen über wirksame, vom Plasma gebildeten Spezies zu erhalten, wurden die Emissionsspektren der Plasmen vermessen. Für den Bereich zwischen 300 nm und 400 nm konnten deutlich die Linien des 2. positiven Stickstoffsystems gemessen werden. Unterhalb von 300 nm traten jedoch keine Emissionen auf, weshalb der antimikrobielle Effekt nicht auf die Wirkung von UV-Photonen zurückzuführen ist. Auch Ozon kann ausgeschlossen werden, da dieses durch einen steigenden Feuchtigkeitsgehalt des Prozessgases reduziert wird. Aus diesem Grund wird dem Hydroxylradikal eine bedeutende Rolle beigemessen. Gebildet wird es durch Elektronenstoßprozesse aus Wasser. Als Ursache für das Fehlen von Emissionslinien von angeregten Hydroxylradikalen sind die im Vergleich zu anderen Plasmen sehr geringe Plasmaleistungen und ein kleines Beobachtungsvolumen zu nennen. Weiterhin stieg, die Abtötungsrate der Mikroorganismen mit steigender Behandlungszeit und Plasmaleistung an.

Die durch die Plasmabehandlung an den Sporen hervorgerufenen Veränderungen wurden mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops untersucht. Es zeigte sich ein Verhalten, das mit den antimikrobiellen Eigenschaften einher ging. Die Bakteriensporen konnten durch das Plasma abgetragen werden. Erwartungsgemäß war dieser Effekt jedoch von der Behandlungszeit und der relativen Luftfeuchtigkeit des Pro-

zessgases abhängig. Erst oberhalb von 50 % relativer Luftfeuchte war innerhalb von fünf Minuten ein deutlicher Abtrag zu erkennen.

Da die an den Sporen gemessenen Veränderungen durch chemische Verbrennungsreaktionen getrieben waren, wurden mittels FTIR die Einflüsse des Plasmas auf natives Polystyrol untersucht. Es konnte eine Oxidation der Polystyroloberflächen belegt werden, welche mit einer deutlichen Erhöhung des polaren Anteils der Oberflächenenergie einher ging, nachgewiesen durch Kontaktwinkelmessungen. Der Behandlungseffekt nahm mit steigendem Abstand der Probe zur Elektrode ab und zeigte für feuchte Prozessgase nur geringe Abhängigkeiten von der relativen Luftfeuchtigkeit.

Aus den in den Voruntersuchungen gewonnenen Erkenntnissen wurden zwei verschiedene Plasmaanordnungen aufgebaut und charakterisiert. Das erste der beiden Systeme ist eine dreidimensionale Oberflächen-DBE. Hier sind beide Elektroden und das Dielektrikum in einer Art von Finger vereinigt. Hier breitet sich das Plasma in definierten Bereichen auf der Außenseite des Plasmafingers aus. Dieses System ermöglicht auch die Behandlung von Flüssigkeit in den Wells. Das zweite System ist eine Korona-DBE. Die Nadelelektroden tauchen wenige Millimeter in die Wells ein. Positioniert wird die Multititerplatte, die als strombegrenzendes Dielektrikum fungiert, auf der flächigen Gegenelektrode. Das Plasma breitet sich in diesem System auch auf den Oberflächen der Wells aus.

Beide Systeme sind in ihren lateralen Abmaßen nicht größer als typische automatisierte Laborposition, wodurch eine gute Integrationsfähigkeit in bestehende automatisierte Labor- und Analysensysteme gegeben ist. Die für den Prozess und die Prozessüberwachung notwendige Peripherie sowie die Schnittstellen zu einem Steuerungs- und Überwachungscomputer wurden definiert. Weiterhin wurde ein genauer Ablauf für die Prozessführung entworfen.

Die in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse sind auch bei der Behandlung von Multiwellplatten gültig. Die Keimabtötung ist abhängig von der realtiven Luftfeuchtigkeit. Es können mit beiden Systemen bei 70 % relativer Luftfeuchtigkeit mehr als vier Log-Stufen an Sporen von *Bac. atrophaeus* innerhalb von 60 s abgetötet werden. Die dazu notwendige mittlere Plasmaleistung beträgt für eine komplette Multititerplatte ca. 6 W für die Plasmafinger und weniger als 4 W im Fall der Korona-DBE.

Mit der Korona-DBE behandelten Zellkulturplatten wurden auf ihre Zellkultureigenschaften hin untersucht. Für die verschiedensten Behandlungsparameter konnten mittels XTT Test nur geringe Abweichungen der Zellvitalität im Vergleich zu einer unbehandelten Zellkulturplatte festgestellt werden. Das unveränderte Zellwachstum wurde auch anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigt. Weiterführend wurde untersucht, welche Auswirkungen die keimtötenden Plasmabehandlungen auf native und nicht für Zellkultur vorbereiteten Multiwellplatten haben. Durch die Plasmabehandlungen wurden die Oberflächeneigenschaften in der Form verändert, dass mit Zellkulturplatten vergleichbare Werte auftraten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit den entwickelten Plasmasystemen und Prozessabläufen in einer Taktzeit von zwei Minuten eine keimreduzierende Behandlung um mehr als vier Größenordnungen von 96er Multiwellplatten in feuchter Luft erreicht wird. Hierbei bleiben die Zellkultureigenschaften erhalten. Ferner können nicht für die Zellkultur geeignete Polystyrolplatten, mit nur einem Prozess, antimikrobiell behandelt und funktionalisiert werden. Zukünftige Aufgaben bestehen in der Verbesserung der Prozessführung sowie der Integration in bestehende automatisierter Laborsysteme. Weiterhin müssen für die Herstellung der Elektrodensysteme neue Materialien geprüft und Fertigungsverfahren entwickelt werden. Wissenschaftliche Herausforderungen bestehen in der Untersuchung und Bewertung von Additiven zum Einsatz im verwendeten Prozessgas, wodurch sich zum Beispiel effektivere Abtötungskinetiken und verbesserte Zellkultureigenschaften erzielen lassen.

Summary

The aim of this work was the development of a plasma system for the antimicrobial treatment of multiwell plates (96). All wells should be treated simultaneously within two minutes using an atmospheric pressure air plasma. By the plasma treatment at least 2 orders of magnitude of bacillus spores have to be inactivated. Following results have been reached:

- Preliminary investigations on flat substrates have been done to obtain fundamental experiences about the antimicrobial effects of dielectric barrier discharges in atmospheric pressure air with different levels of humidity. It was possible to inactivate spores of *Bacillus atrophaeus*. This effect increases with rising levels of relative humidity.
- An erosion of the spores has been observed by means of atomic force microscopy. For the first time the same spores have been measured before and after each treatment step. The erosion rate increases with an increasing level of humidity in the process gas.
- Two systems for the treatment of multiwell plates (8x12) have been build by the findings of the preliminary investigations.
- All findings from the preliminary investigations are also valid for treatment of multiwell plates.
- No significant alterations of the cell culture properties have been found compared with untreated multiwell plates.

From literature only insufficient information about the antimicrobial effect of air plasmas are known. Due to this following preliminary investigations were necessary. For this work a dielectric barrier surface discharge has been used as plasma source. Preliminary investigations on flat substrates have been done to obtain information about the antimicrobial activity and changes of the surface properties of polystyrene.

For a distance of $0,6\text{ mm}$ between sample and electrode a reduction of four log-levels has been achieved within $2,5\text{ min}$. The success of the plasma treatment strongly depends on the relative humidity of the process gas. A higher relative

humidity leads to an increase of the micro-organism killing effect. In order to get an answer about the active species which have been generated in the plasma the emission spectrum of the plasma has been detected. In the range between 300 *nm* and 400 *nm* lines of the second positive nitrogen system were detected. While an emission below 300 *nm* is missing the antimicrobial effect is not caused by UV photons which are known to be germicidal. Also ozone can be excluded, because of its decreasing concentration with increasing humidity of the process gas. For this reason it is suggested that the hydroxyl radical which is formed by direct electron impact with water molecules plays an important role, although no emission of excited hydroxyl radicals was measured. One explanation for this is the comparable low plasma power and the small observation volume. Furthermore, the killing rate of the micro-organisms increases with rising treatment time and plasma power.

The morphological changes of the spores was determined by means of an atomic force microscope. The behavior of the changes was comparable to the antimicrobial effect. It was possible to remove the spores nearly completely by plasma treatment but was in a similar way depending on the relative air humidity. A clear erosion within 5 *min* was only detectable above 50 % relative gas humidity.

Because of the changes of the spores by chemical combustion reactions FTIR spectroscopy has been utilized to measure the influence of plasma treatment on native polystyrene. An oxidation of the surface takes place and an increasing polar component of the surface energy has been detected by means of contact angle measurement. This treatment effect was decreasing with increasing distance between plasma electrode and sample and has only a weak dependence of the gas humidity.

From these preliminary investigations two plasma systems have been derived, build and characterized. The first system was a three-dimensional surface dielectric barrier discharge. Both electrode and the dielectric material are united in a kind of plasma finger. The plasma is spreading of a defined area onto the outside of the plasma finger. Using this type of system it is possible to treat liquids inside the wells. The second system is called corona dielectric barrier discharge. Needle electrodes are emerged a few millimeter into the wells. The multiwell plate functioned as dielectric barrier and was placed on the extended counter electrode. In

this type of arrangement the plasma is formed in the volume and covers the inside wall of the wells.

Both systems have sizes like a typical automated lab position. By this an integration in existing automated analytical systems is possible. Necessary interfaces and instruments for the process control were specified. Furthermore, the sequence of operation was developed.

All findings from the preliminary investigations are also valid for treatment of multiwell plates. The inactivation of micro-organisms is depending on the relative process gas humidity. At 70 % relative humidity more than four log-levels of *Bac. atrophaeus* spore were killed within 60 s. The plasma power was 6 W for the plasma finger and 4 W for the corona dielectric barrier discharge.

Cell culture plates have been treated using the corona dielectric barrier discharge in order to investigate the cell culture properties after plasma treatment. The cell viability for different treatment parameters has been measured by means of a XTT assay. For only a small number of parameters a slight variation was measured compared with untreated multiwell plates. The unchanged cell growth was confirmed by light microscopy. Non cell culture multiwell plates have been treated in a similar way. By plasma treatment cell culture properties like in commercial cell culture plates have been obtained.

In summary one can say that the developed plasma systems can reduce more than 4 log-levels of bacillus spores in wet air within 2 min. The treated well plates have the same cell culture properties than before the antimicrobial treatment. Also non-cell culture plates can be treated and equipped with cell culture properties.

Further work is necessary to optimize the process and the integration into existing automated lab systems. New materials and techniques need to be proven for the electrodes and their preparation. One scientific challenge is the testing of additives for the use in the process gas in order to obtain a more effective inactivation of the micro-organisms and enhanced cell culture properties.

Anhang A

Abkürzungsverzeichnis

AD-Wandler	Analog-Digital-Wandler
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. <i>atomic force microscope</i>)
ALP	automatisierte Laborposition (engl. <i>automated lab position</i>)
ATR	engl. attenuated total reflection
CCD	Halbleiterbauteil unter anderem zur Bilderfassung (engl. <i>charge-coupled-device</i>)
CHO	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster
DA-Wandler	Digital-Analog-Wandler
DBE	dielektrische Barrierenentladung (oft auch als dielektrisch behinderte Entladung bezeichnet)
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
HaCaT	humane Keratinocyten (engl. <i>human adult low calcium temperature keratinocytes</i>)
HEK	menschliche embrionale Nierenzellen (engl. <i>human embryonic kidney</i>)
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms benannt nach Henrietta Lacks, erste menschliche permanente Zelllinie
ICCD	intensitätsverstärkte CCD (engl. <i>intensified-charge-coupled-device</i>)
IR	Infrarot
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid

OES	optische Emissionsspektroskopie
PBS	phosphahtgepufferte Salzlösong (engl.: <i>phosphate buffert saline</i>)
PMS	N-Methyldibenzopyrazinmethylsulfat
RPMI	Zellkulturmedium für humane und tierische Zelllinien, wurde am Roswell Park Memorial Institut entwickelt
RNS	reaktive Stickstoff Spezies (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
UV	ultraviolett Strahlung
VUV	Vakuum ultraviolett Strahlung, kann sich nur im Vakuum ausbreiten
XTT	Natrium-3,3'-(1-phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium-bis-(4-methoxy-6-nitro)benzensulphonsäure

Anhang B

Versuchsaufbau und Analytik

Der Versuchsaufbau für alle Untersuchungen an ebenen Substraten sowie zur Bestimmung der Plasmaeigenschaften, Plasmaleistung und optischen Emission, ist in Abbildung B.1 dargestellt.

Das System bestand aus einer invertierten T-ähnlichen Kammer(a) mit zylindrischen Durchmessern von 160 mm . Spannungs- und Gasversorgung (e, j) erfolgten über die obere Platte (b), welche über 3 Flansche verfügte. Die Rückseite der Kammer war mit einem Blindflansch (c) verschlossen, während die Vorderseite mit einem Fenster (d) ausgestattet war, welches die Überwachung der Prozesse erlaubte. Die gesamte Prozesskammer hatte ein Gesamtvolumen von ca. 10 l und war komplett luftdicht verschließbar.

Die Elektrode(i) wurde aus Gründen der elektrischen Isolation auf einer Platte aus Teflon (f) fixiert. Elektrode und Teflonplatte konnten über die Vorderseite der Kammer eingeschoben werden. Die Regulierung der Gaszufuhr wurde durch zwei Massenflußregler realisiert. Einer der Kanäle ging zur Anreicherung mit Feuchtigkeit durch eine Gaswaschflasche mit 1 l Gesamtvolumen. Die Gaswaschflasche war mit 400 ml destilliertem Wasser gefüllt. Das Gas wurde durch ein gesinter-tes Edelstahlrohr in das Wasser gedrückt um möglichst kleine Luftblasen für eine bessere Feuchtaufnahme zu erhalten. Die relative Luftfeuchtigkeit im System wurde mittels eines Luftfeuchtigkeitssensors am Gasausgang(k) der Versuchskammer bestimmt.

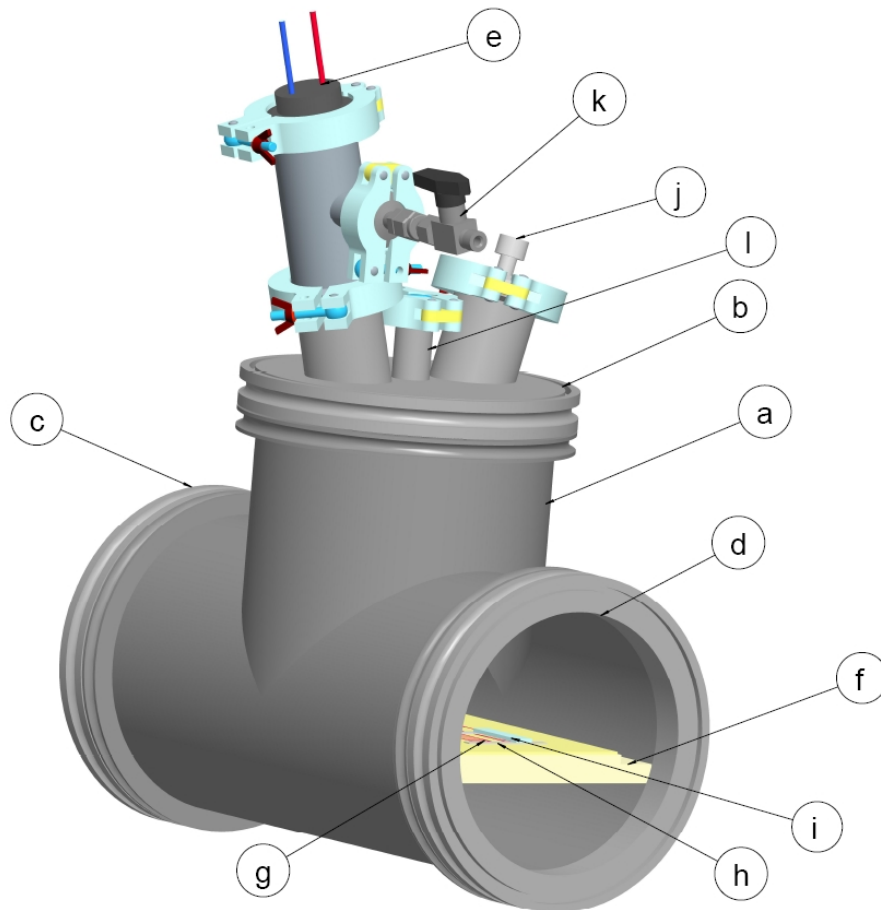


Abbildung B.1: Aufbau des Systems für Versuche auf ebenen Substraten und zur Bestimmung der Plasmaleistung und optischen Emission des Plasmas: a- Kammer, b- obere Flanschplatte, c- Blindflansch auf der Rückseite, d- Sichtfenster auf der Frontseite, e- Hochspannungsdurchführung, f- Isolierplatte aus Teflon, g- Probe, h- Distanzstücke, i- Elektrode, j- Gaseinlass, k- Gasauslass, l- Zusatzport für weitere Diagnostik (OES)

B.1 Elektrodensystem

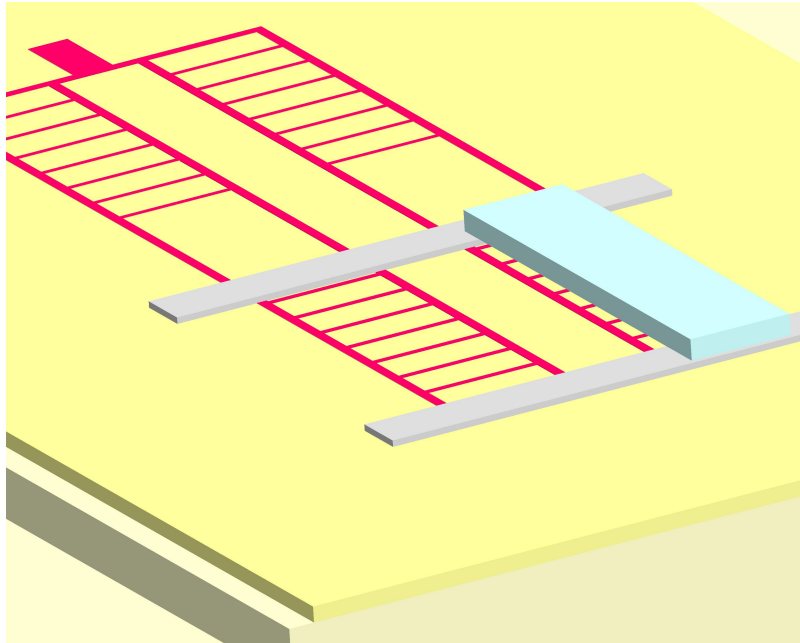


Abbildung B.2: strukturierte Seite der Elektrode (rot) mit Distanzstücken (grau) und Probe (blau) auf isolierender Teflonplatte (siehe Abbildung B.1)

Die Elektrodenanordnung, wie sie in Abbildung B.2 gezeigt wird, wurde aus Basismaterial für Leiterplatten hergestellt. Der enthaltene Nichtleiter, welcher für die Anwendung als Dielektrikum fungiert, ist ein Laminat aus Epoxidharz und Glasfasergewebe vom Typ FR4 mit einer Materialstärke von $1,5\text{ mm}$. Der Oberflächenwiderstand von FR4 beträgt $10^{12}\ \Omega$. Mit einer Dielektrikumskonstanten von 4,0 bis 4,7 liegt man im Bereich der Werte für Glas. Die maximale Einsatztemperatur des FR4 Materials liegt bei $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bearbeitet wurde die beidseitige $35\ \mu\text{m}$ dicke Kupferauflage mittels Ätzverfahren.

Die fingerartige Elektrode, welche sich auf der Oberseite des Dielektrikums befindet, besteht aus Stegen, die 1 mm breit und $4,5\text{ mm}$ voneinander entfernt sind. Dieser Bereich bildet den hochspannungsführenden Teil der Elektrodenanordnung. Auf der Rückseite befindet sich die flächenhafte Gegenelektrode. Diese besitzt die gleichen Außenmaße wie die fingerartige Struktur und ist direkt un-

ter dieser lokalisiert. Daraus ergibt sich eine maximale Fläche von $31,3 \text{ cm}^2$ auf denen sich das Plasma ausbreiten kann.

B.2 Hochspannungsversorgung

Als Hochspannungsquelle diente eine Impulsspannungsquelle vom Ingenieurbüro Klein¹. Diese Quelle liefert Fouriersyntheseimpulse eines Nadelimpulses. Der Ausgangsimpuls ist dabei die Summe der ersten drei Fourierkomponenten [119]. Abbildung B.3 zeigt die Leerlaufspannung des Generators, gemessen mit einem Oszilloskop der Firma Tektronix (TDS 3052) und dem Hochspannungsmesskopf P6015A, ebenfalls von Tektronix.

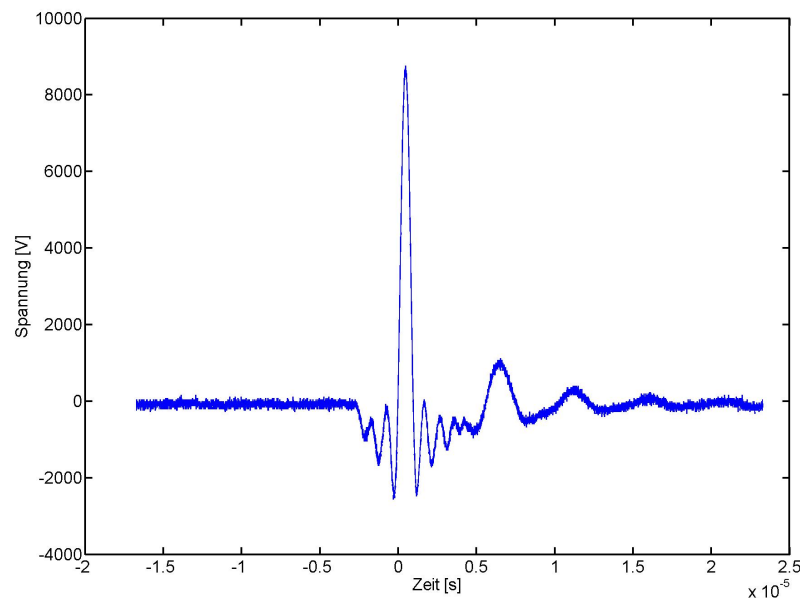


Abbildung B.3: *positiver Ausgangsimpuls des Hochspannungsgenerators, bei minimaler Ausgangsspannung ohne Last*

Die Freischaltung des Impulsspannungsgenerators erfolgte über einen Funktionsgenerator (Tektronix AFG 310). Dieser generierte Rechteckimpulse mit einer Am-

¹von-Broich-Straße 5, 52072 Aachen

Die weiteren elektrischen Kenndaten dieser Hochspannungsquelle sind:

Anzahl der Resonanzkreise	3
Ausgangskapazität	200 pF
max. Impulsamplitude	20 kV
Pulswiederholrate	0 - 25 kHz

plitude von 5 V bei einem Offset von 2,5 V. Die Freischaltung des Impulsgenerators erfolgt in der Low Phase des Rechtecksignals. Die Signale wurden vom Funktionsgenerator zum Impulsgenerator über einen Optokoppler übertragen, um eine galvanische Trennung der Schaltkreise zu erreichen.

B.3 Plasmadiagnostik

B.3.1 OES

Über den mittleren Port in der Deckplatte des Systems (siehe Abbildung B.1) wurde ein am unteren Ende mit einer Quarzglasplatte verschlossenes Rohr integriert. Das Rohr wurde so positioniert, dass die Quarzglasplatte einen Abstand von $x = 10 \text{ mm}$ zum Dielektrikum hatte. Im Rohr wurde ein Lichtleiter fixiert der das einfallende Licht zum Eintrittsspalt des Monochromators *SpectraPro-500i* der Firma Acton Research Corporation leitete. Dieser Monochromator arbeitete mit einer Czerny Turner Anordnung. Das auf den Eintrittsspalt fallende Licht wurde mit Hilfe eines Konkavspiegels parallelisiert, am Gitter gebeugt und anschließend durch einen weiteren Spiegel auf den Austrittsspalt gelenkt. Das verwendete Gitter war ein holographisch, geblaztes Phasengitter mit einer Gitterkonstanten von $x = 1200 \text{ nm}^{-1}$. Die Blazewellenlänge betrug $x = 250 \text{ nm}$.

Die Detektion der Spektren erfolgte über eine CCD Kamera der Firma Princeton Electronics die mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) ausgestattet war. Der SEV und die Kamera wurden über die Software *WinSpec* gesteuert. Das Triggersignal zur Pulsung des Plasmas wurde ebenfalls zur Triggerung der Kamera benutzt um gleichbleibende Integrationsfenster für die OES Messungen

zu erhalten. Es wurde jeweils über 10 Messungen von je 1 s gemittelt.

B.3.2 ICCD-Aufnahmen

Zur Bestimmung der Plasmastrukturen wurden Aufnahmen mit einer feststehenden ICCD Kamera *dicam pro* (PCO AG) gemacht. Die Plasmaquelle war zur genaueren Positionierung auf einem xyz-Manipulator befestigt. Das vor die Kamera montierte Objektiv war ein mit UV-Linsen ausgestattetes Fernfeldmikroskop *QM100* (Questar Corporation, USA). Das Triggersignal der Hochspannungsquelle wurde an die Kamera weitergeleitet. Per zugehöriger Software wurden Delay und Belichtungszeit gesteuert.

B.3.3 Plasmaleistung

Zur Bestimmung der Plasmaleistung wurde die Spannung über der Elektrode U_a und über dem Messkondensator U_c mit einem digitalem Speicheroszilloskop *Classic 9500* der Firma Gould Instrument System gemessen. Dieses Speicheroszilloskop hatte eine Bandbreite von 400 MHz bei 2 GSamples/sec. Zur Erfassung von U_a wurde ein Tastkopf mit dem Tastverhältnis von 1:1000 verwendet. Für U_c genügte ein Tastkopf mit dem Tastverhältnis von 1:100. Die gespeicherten Daten wurden mit der Software *Transfer Acquisition 2.20.10* ins ASCII Format für die weitere Bearbeitung umgewandelt.

Aus der Spannung U_c und der Kapazität des Messkondensator $C_m = 9,8 nF$ wurde die auf dem Kondensator befindliche Ladung bestimmt. Aus der so erhaltenen Lissajousfigur wurde durch Integration der von der Kurve eingeschlossenen Fläche, die Zyklusenergie über eine Periode ermittelt. Multipliziert man die Zyklusenergie mit der Frequenz der Hochspannung und dem eventuell verwendeten Pulsmuster, so kann man auf die mittlere in das Plasma eingebrachte Leistung schließen.

B.4 Oberflächendiagnostik

B.4.1 Kontaktwinkel

Die Bestimmung der Oberflächenenergie und deren Einzelkomponenten der un-behandelten und behandelten Polystyroloberflächen erfolgte mit dem it Contact Angle System OCA30 der Firma DataPhysics. Durch Verschieben der Probe in allen 3 Raumrichtungen war eine detaillierte Untersuchung an verschiedenen definierten Punkten der Oberflächen möglich. Es konnten Tropfen mit Volumina von 30 nl bis 100 nl auf den Proben abgesetzt werden. Die Steuerung der Tropfengröße als auch die Positionierung wurden mit der *Software for OCA and PCA* in der Version 2.02 realisiert.

Für die Untersuchungen der Oberflächen wurden Wasser, Glycerol und Diiodmethan verwendet. Es wurden 40 Tropfen von jeder Flüssigkeit in einem Abstand von je 1 mm auf einer Linie entlang der Längskante der Proben abgesetzt. Die versuchsrelevanten Eigenschaften der Messflüssigkeiten sind in Tabelle B.1 zusammengetragen.

B.4.2 FTIR

Die FTIR Analysen erfolgten mit dem Gerät *Spectrum One* der Firma Perkin Elmer und wurden im ATR-Modus durchgeführt.

Die Oberflächen wurden im Bereich 4000 cm^{-1} bis 650 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} vermessen. Es wurde immer über 10 Messungen gemittelt. Die so erhaltenen Spektren wurden über die mitgelieferte Software *Spectrum* in der Version 5.0.1 automatisch geglättet und in ihrer Basislinie korrigiert.

Die Proben konnten über ihre gesamte plasmabehandelte Länge von 40 mm oder im Bereich von $x = 13\text{ mm}$ bis $x = 28\text{ mm}$ mit einer Auflösung von 1 mm vermessen werden.

B.4.3 Rasterkraftmikroskopie

Vor der Plasmabehandlung wurden die Sporen weitestgehend, von dem sie umgebenden Biofilm, gereinigt. Hierzu wurden 1,5 ml einer Sporensuspension in

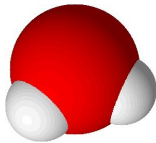
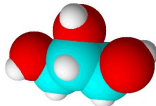
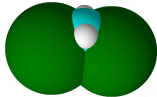
Flüssigkeit	Struktur	dispers [mN/m]	polar [mN/m]	H- Brückenb. [mN/m]
Wasser		29,1	1,3	42,4
Glycerol		37,4	0,2	25,8
Diiodmethan		50,8	0,9	0

Tabelle B.1: Oberflächenenergien der Messflüssigkeiten mit chemischer Struktur als Kalottenmodell

einem kleinen Reaktionsgefäß dreimalig für 10 *min* mit einem Ultraschallbad (Transsonic 570/H) behandelt. Zwischen den Schritten wurden die Reaktionsgefäße im Kühlschrank wieder herunter gekühlt, um Einflüsse auf die Sporen durch thermische Effekte zu minimieren. Nach der Behandlung mit Ultraschall wurde die Sporensuspension über einen Filter mit einer Porengröße von 2 μm filtriert. Die gereinigten Sporen wurden mittels sterilem destilliertem Wasser vom Filter abgespült.

Um eine optimale Sporenverteilung und Konzentration auf den Testsubstraten zu erhalten, wurde die Suspension schrittweise verdünnt. Ziel war eine möglichst hohe Anzahl an isoliert liegende Sporen bei gleichzeitig maximaler Sporenkonzentration zu erreichen. Ein Tropfen von 1,5 μl wurde auf Glas oder Glimmer eingetrocknet und anschließend das Verteilungsbild der Sporen unter einem Auflichtmikroskop bewertet. Von der fertigen Suspension wurden Proben mit je 1,5 μl auf Glimmer oder Glas angefertigt. Diese Proben wurden, nachdem sie eingetrocknet waren, auf die Probenträger für das AFM geklebt.

Die Messungen wurden mit einem CPII von Digital Instruments, vertrieben von Veeco Instruments, im Kontaktmodus durchgeführt. MSCT-AUHW von Veeco Instruments wurden als Messspitzen verwendet.

Die Proben wurden vor und nach jeder Plasmabehandlung an der gleichen Position vermessen. Für die Plasmabehandlung wurde ein System ähnlich dem von Hähnel et al. [4] eingesetzt. Die Elektrodenanordnung wurde in der Form modifiziert, dass die obere der beiden Elektroden rund mit einem äußeren Durchmesser von 18 *mm* und einem inneren Durchmesser von 11 *mm* ausgeführt war. Die untere Elektrode war flächig ausgeführt und hatte die gleichen äußeren Dimensionen wie die obere Elektrode, unter welcher sie direkt positioniert war.

In Anlehnung an das in Hähnel et al. [4] beschriebene Verfahren wurden die Proben in einer Kammer (siehe Kapitel B) unter definierten Atmosphären bei einem Abstand zur Elektrode von 0,6 *mm* behandelt.

B.5 Mikrobiologie

Ebene Substrate

Für die Feststellung der Reduzierung von Mikroorganismen durch Plasmen wur-

den Sporen von *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 verwendet. Die Sporen lagen in sterilem Wasser vor. Als Probenträger wurden Streifen aus Polyethylen mit den Maßen $33 \times 8 \times 2 \text{ mm}$ verwendet. Diese wurden zuvor mit 70 % Ethanol gewaschen und mit sterilem Wasser gespült um Verschmutzungen und Fremdverkeimung zu entfernen. Durch eine zusätzliche Behandlung mit einem standardisiertem Sauerstoff Mikrowellenplasma wurde eine bessere Benetzung und Verteilung der Sporensuspension erreicht.

Auf einer Seite der Proben wurde 0,1 ml der entsprechenden Sporensuspension verteilt, so dass möglichst viel Fläche ausgenutzt wurde, aber an den Rändern genügend Platz zum Auflegen auf die Distanzstücke verblieb. Die Proben wurden anschließend unter der Laminarflowbox getrocknet und ca. 30 min nach der vollständigen Verdunstung des Wassers dem Plasmaversuch zugeführt. Jeder Versuch wurde mit vier Proben, die alle gleichzeitig behandelt wurden, durchgeführt. Zusätzlich wurden für jeden Versuchstag fünf Kontrollstreifen angelegt.

Für die Plasmabehandlung wurden je Versuch vier Proben mit der mit Mikroorganismen belegten Seite in Richtung Dielektrikum auf den Distanzstücken platziert. Nach dem Versuch wurden die Proben wieder mit einer sterilen Pinzette entnommen und in ein Reagenzglas mit Glaskügelchen und 10 ml eines phosphatgepufferten Salzlösung (engl.: *phosphate buffert saline*) (PBS)/Tween Gemisches verbracht. Durch mindestens 15-minütiges Schütteln der Reagenzgläser wurden die Sporen von den Polyethylenstreifen abgelöst. Ein Erwärmen der Reagenzgläser auf 80°C für 10 min tötete vegetative Mikroorganismen ab, da nur Sporen für die Tests genutzt werden sollten.

Von den so erhaltenen Sporensuspensionen wurden Verdünnungsreihen mit 3 Stufen für die behandelten Proben und 5 Stufen für die Kontrollen angelegt. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden auf Agarplatten (Caso Merck) aufgetropft und mit einem Drigalskispatel unter gleichzeitigem drehen der Petrischale gleichmäßig verstrichen. Agarplatten mit Sporen von *Bac. atrophaeus* wurden bei 37°C für mindestens 18 Stunden bebrütet. Vor einem kontrastreichen, meist schwarzem, Hintergrund wurden anschließend die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Aus den Verdünnungen einer jeden Probe konnte durch Mittelung die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Objekt oder Milliliter errechnet werden. Dabei wurde die höchste Verdünnungsstufe mit zweistelliger Koloniezahl mit

dem 10fachen gewichtet.

Wellplatten

Abweichend von der beschriebenen Probenbehandlung für ebene Substrate wurden Versuche in 96er Wellplatten durchgeführt. Je Well wurden 5 Tropfen mit je $0,5 \mu\text{l}$ der Sporensuspension auf den Böden, Wänden oder beiden abgesetzt und ebenfalls eingetrocknet. Mit den Plasmafingern wurden 4 Wells je Platte gleichzeitig behandelt. Im Fall der Korona-DBE wurden 16 zufällig ausgewählte Wells kontaminiert und die komplette Multiwellplatte behandelt. Von den 16 zuvor kontaminierten Wells wurden acht Wells ausgewählt und hinsichtlich der verbliebenen koloniebildenden Einheiten untersucht. Die Kontrollen wurden auf separaten Wellplatten mitgeführt. Nach der Behandlung wurden die mit Mikroorganismen versehenen Wells mit $200 \mu\text{l}$ des PBS/Tween Gemisches ausgespült und wie schon beschrieben, verdünnt, ausplattiert, bebrütet und gezählt. Der Reduktionsfaktor, als ein Maß für die Effizienz der einzelnen Versuche, wurde aus Anzahl von lebenden Mikroorganismen pro Streifen oder Well N_i und der mittleren Ausgangszahl \bar{N}_0 an Mikroorganismen pro Objekt ermittelt.

$$\text{Reduktionsfaktor} = \log_{10} \bar{N}_0 - \log_{10} N_i \quad (\text{B.1})$$

Die Detektionsgrenze für dieses Verfahren liegt bei 100 koloniebildenden Einheiten pro Streifen und einer koloniebildenden Einheit pro Well.

B.6 Zellbiologie

Die Bestimmung der Zellvitalität wurde mit Hilfe des XTT Tests in Anlehnung an das in Schmitz [107] vorgeschlagenen Protokoll vorgenommen.

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank vorgenommen, um ein steriles Arbeiten zu ermöglichen.

1. In die zu testenden Wells der mit Plasma behandelten und unbehandelten 96er Wellplatten wurden 5000 Zellen der HaCaT Zelllinie eingesät und in $100 \mu\text{l}$ RPMI Medium für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Die Wells, welche sich in direkter Nachbarschaft zu den mit Zellen versehenen Wells befanden, wurden mit jeweils $100\ \mu\text{l}$ sterilem bidestilliertem Wasser befüllt um gleichmäßige Bedingungen auf der gesamten Wellplatte zu schaffen.

2. Nach den ersten 24 Stunden Kultivierungszeit wurde das Medium aus den Wells entnommen und durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden unter gleichen Bedingungen im Brutschrank kultiviert.
3. Die für den Test verwendete Reaktionslösung wurde stets frisch vor der Verwendung durch Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ PMS Lösung zu $5\ \text{ml}$ XTT-Lösung, welche auf 37°C erwärmt waren, hergestellt. Die XTT-Lösung wurde durch Lösen von $1\ \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ XTT Salz in bidestilliertem und sterilem Wasser hergestellt. Die PMS Aktivierungsreagenz war eine 1 % Lösung.
4. $50\ \mu\text{l}$ der Reaktionslösung wurden je Well hinzu gegeben. Die Wellplatten wurden für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert.
5. Vor dem Vermessen der Platten wurden diese leicht geschüttelt um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes in den Well zu erreichen. Eventuell entstandene Luftbläschen wurde mit einer sterilen Nadel beseitigt.
6. Auf einem Photometer wurde die Absorption der entsprechenden Wells bei einer Wellenlänge von $490\ \text{nm}$ vermessen. Die Absorption bei der Wellenlänge von $630\ \text{nm}$ diente als Referenz zur Bestimmung der unspezifischen Reaktionen und wurde direkt von der bei $490\ \text{nm}$ abgezogen.

Anhang C

Ergänzende Abbildungen und Tabellen

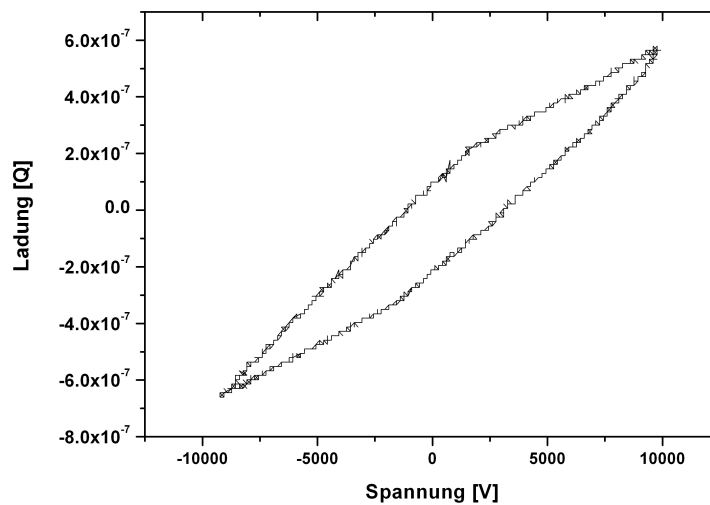


Abbildung C.1: Lissajousfigur bei 20 % relativer Luftfeuchtigkeit der in Kapitel B.1 dargestellten Elektrode zur Behandlung zweidimensionaler Substrate

Tabelle C.1: Standardabweichungen der Oberflächenenergien der einzelnen Bindungskomponenten (dispers/ polar/ Wasserstoffbrückenbindungen) in Nm/m zu Abbildung 2.4 für verschiedene Behandlungszeiten und relative Luftfeuchtigkeiten

Zeit	relative Luftfeuchtigkeit			
	0 %	30 %	50 %	70 %
30s	3,9/19,3/0,4	5,5/26,5/0,7	5,8/22,1/0,3	5,6/28,7/0,5
150s	3,2/22,1/0,8	6,7/96,2/1,9	5,2/59,7/3,0	6,2/35,0/2,3
300s	4,2/52,7/2,4	3,4/32,4/2,5	4,4/58,9/2,6	5,8/70,9/1,8
900s	2,9/28,6/2,2	2,7/32,2/1,8	2,2/23,9/1,7	3,7/41,7/1,5

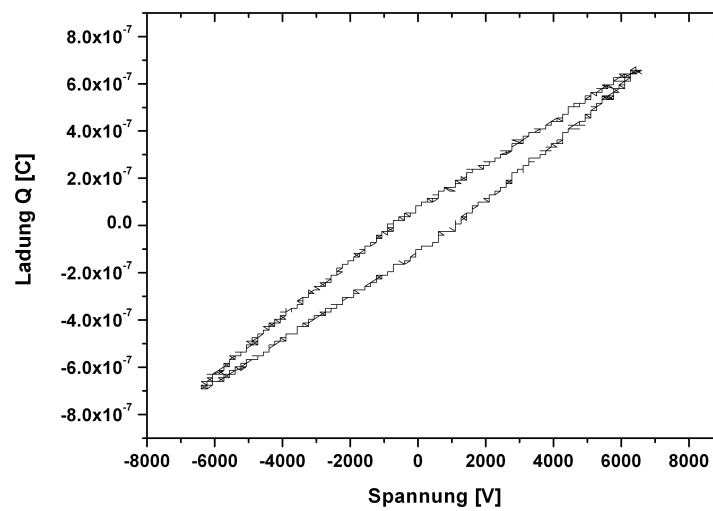


Abbildung C.2: Lissajousfigur bei 20 % relativer Luftfeuchtigkeit gemessen für 16 Plasmafinger

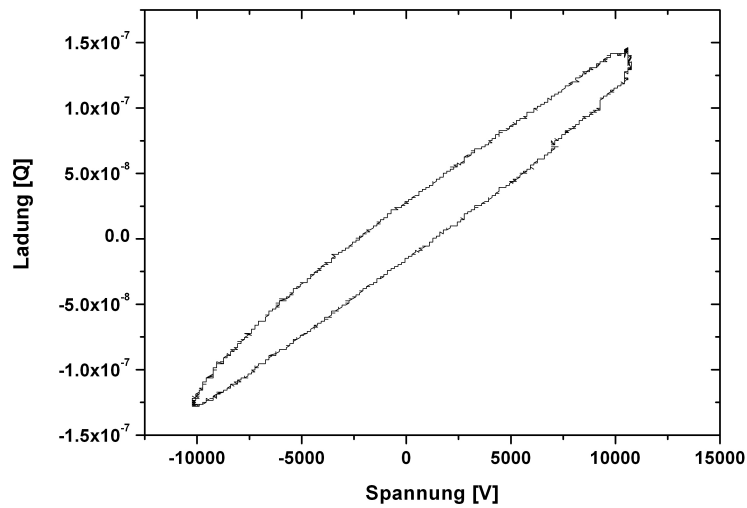


Abbildung C.3: Lissajousfigur bei 20 % relativer Luftfeuchtigkeit gemessen für eine 96er Korona-DBE

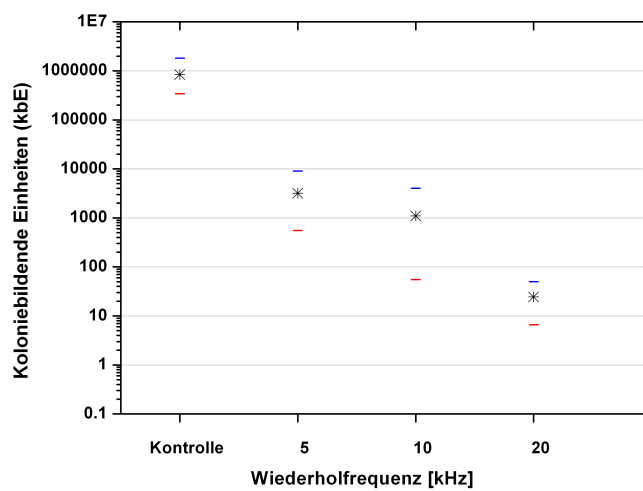


Abbildung C.4: Koloniebildende Einheiten in Abhängigkeit von der Wiederholfrequenz, relative Luftfeuchtigkeit 70 %, Generatorspannung 12 kV, Behandlungszeit 30 s

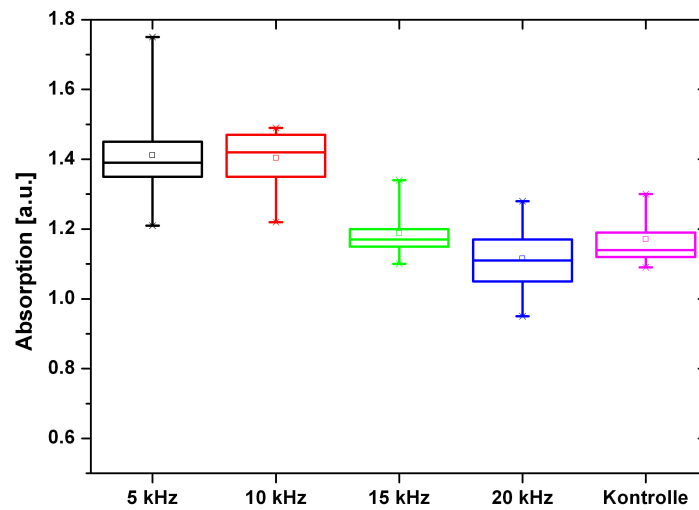


Abbildung C.5: XTT Absorptionssignal in Abhängigkeit von der Wiederholfrequenz; Nunclon[®] Oberfläche, relative Luftfeuchtigkeit des Prozessgases 70 %, Spannung 12 kV, Plasma An-Zeit 25 %, Behandlungszeit 60 s; Box-Whisker-Plot: Quartile/Mittelwert/Min/Max

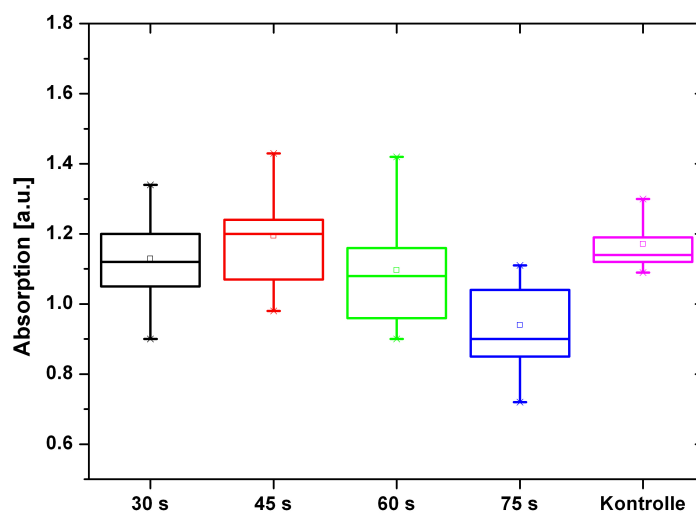


Abbildung C.6: XTT Absorptionssignal in Abhängigkeit von der Behandlungszeit; Diagnostikplatte VWR, relative Luftfeuchtigkeit des Prozessgases 70 %, Spannung 12 kV, Plasma An-Zeit 25 %, Lagerung bei 0 % relativer Luftfeuchtigkeit für 10 min direkt nach der Plasmabehandlung, Kontrolle: Nunclon® Oberfläche; Box-Whisker-Plot: Quartile/Mittelwert/Min/Max

Literaturverzeichnis

- [1] THUROW, K. ; HÄHNEL, M. ; WELTMANN, K.-D.: Automatisierte Plasmatechnologie für die Wirkstoffentwicklung. In: Vakuum in Forschung und Praxis 21 (2009), Nr. 4, S. 16–18
- [2] WALLHÄUSSER, K.H.: Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung: Keimidentifizierung - Betriebshygiene. Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York, 1995
- [3] 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), Nr. 1-2, S. 1–21
- [4] HÄHNEL, M. ; WOEDTKE, T. von ; WELTMANN, K.-D.: Influence of the Air Humidity on the Reduction of Bacillus Spores in a Defined Environment at Atmospheric Pressure Using a Dielectric Barrier Surface Discharge. In: Plasma Processes and Polymers 7 (2009), S. 244–249
- [5] BRANDENBURG, R. ; EHLBECK, J. ; STIEBER, M. ; WOEDTKE, T. von ; ZEYMER, J. ; SCHLUTER, O. ; WELTMANN, K. D.: Antimicrobial treatment of heat sensitive materials by means of atmospheric pressure rf-driven plasma jet. In: Contributions to Plasma Physics 47 (2007), Nr. 1-2, S. 72–79
- [6] SIEMENS, W.: Über die elektrostatische Induktion und über die Verzögerung des Stromes durch Flaschendrähte. In: Poggendorfs Ann. Phys. Chem. 102 (1857), Nr. 66

- [7] KOGELSCHATZ, U.: Dielectric-barrier discharges: Their history, discharge physics, and industrial applications. In: Plasma Chemistry and Plasma Processing 23 (2003), Nr. 1, S. 1–46
- [8] KOGELSCHATZ, U.: Atmospheric-pressure plasma technology. In: Plasma Physics and Controlled Fusion 46 (2004), S. B63–B75
- [9] GOOSSENS, O. ; DEKEMPENEER, E. ; VANGENEUGDEN, D. ; LEEST, R. Van d. ; LEYS, C.: Application of atmospheric pressure dielectric barrier discharges in deposition, cleaning and activation. In: Surface & Coatings Technology 142 (2001), S. 474–481
- [10] WAGNER, H. E. ; BRANDENBURG, R. ; KOZLOV, K. V. ; SONNENFELD, A. ; MICHEL, P. ; BEHNKE, J. F.: The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment. In: Vacuum 71 (2003), Nr. 3, S. 417–436
- [11] BECKER, K. ; KOUTSOSPYROS, A. ; YIN, S. M. ; CHRISTODOULATOS, C. ; ABRAMZON, N. ; JOAQUIN, J. C. ; BRELLES-MARINO, G.: Environmental and biological applications of microplasmas. In: Plasma Physics and Controlled Fusion 47 (2005), S. B513–B523
- [12] CERNAK, M. ; RAHEL, J. ; KOVACIK, D. ; SIMOR, M. ; BRABLEC, A. ; SLAVICEK, P.: Generation of thin surface plasma layers for atmospheric-pressure surface treatments. In: Contributions to Plasma Physics 44 (2004), Nr. 5-6, S. 492–495
- [13] THYEN, R. ; HOPFNER, K. ; KLAKE, N. ; KLAGES, C.P.: Cleaning of Silicon and Steel Surfaces Using Dielectric Barrier Discharges. In: Plasmas and Polymers 5 (2000), Nr. 12, S. 91–102
- [14] KLAGES, C. P. ; EICHLER, M.: Coating and cleaning of surfaces with atmospheric pressure plasmas. In: Vakuum in Forschung und Praxis 14 (2002), Nr. 3, S. 149–155
- [15] Europäisches Arzneibuch 5. Ausg. Amtliche deutsche Ausgabe. Eschborn: Deutscher Apotheker Verlag, Govi - Pharmazeutischer Verlag, 2005

- [16] KRAMER, A. ; ASSADIAN, O.: Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York, 2008
- [17] STEUER, W. ; SCHUBERT, F.: Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung. 8. B.Behr's Verlag GmbH & Co.KG, Hamburg, 2007
- [18] ODIC, E. ; GOLDMAN, A. ; GOLDMAN, M. ; DELAVEAU, S. ; LE HEGARAT, F.: Plasma sterilization technologies and processes. In: High Temperature Material Processes 6 (2002), Nr. 3, S. 385–396
- [19] LAROUSSE, M.: Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. In: Plasma Processes and Polymers 2 (2005), Nr. 5, S. 391–400
- [20] PHILIP, N. ; SAOUDI, B. ; CREVIER, M. C. ; MOISAN, M. ; BARBEAU, J. ; PELLETIER, J.: The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: The case of N-2-O-2 mixtures. In: IEEE Transactions on Plasma Science 30 (2002), Nr. 4, S. 1429–1436
- [21] MOREAU, S. ; MOISAN, M. ; TABRIZIAN, M. ; BARBEAU, J. ; PELLETIER, J. ; RICARD, A. ; YAHIA, L.: Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: Influence of the operating conditions. In: Journal of Applied Physics 88 (2000), Nr. 2, S. 1166–1174
- [22] 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 & Technology 13 (2004), Nr. 2, S. 351–358
- [23] BOUDAM, M. K. ; MOISAN, M. ; SAOUDI, B. ; POPOVICI, C. ; GHERARDI, N. ; MASSINES, F.: Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. In: Journal of Physics D-Applied Physics 39 (2006), Nr. 16, S. 3494–3507

- [24] GAUNT, L. F. ; BEGGS, C. B. ; GEORGHIOU, G. E.: Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: A review. In: IEEE Transactions on Plasma Science 34 (2006), Nr. 4, S. 1257–1269
- [25] 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), Nr. 1-3, S. 81–86
- [26] SHARMA, A. ; PRUDEN, A. ; STAN, O. ; COLLINS, G. J.: Bacterial inactivation using an RF-powered atmospheric pressure plasma. In: IEEE Transactions on Plasma Science 34 (2006), Nr. 4, S. 1290–1296
- [27] TROMPETER, F. J. ; NEFF, W. J. ; FRANKEN, O. ; HEISE, M. ; NEIGER, M. ; LIU, S. H. ; 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), Nr. 4, S. 1416–1423
- [28] DORAI, R. ; KUSHNER, M. J.: A model for plasma modification of polypropylene using atmospheric pressure discharges. In: Journal of Physics D-Applied Physics 36 (2003), Nr. 6, S. 666–685
- [29] LEVEILLE, V. ; COULOMBE, S.: Atomic oxygen production and exploration of reaction mechanisms in a He-O₂ atmospheric pressure glow discharge torch. In: Plasma Processes and Polymers 3 (2006), Nr. 8, S. 587–596
- [30] LAROUSSI, M. ; TENDERO, C. ; LU, X. ; ALLA, S. ; HYNES, W. L.: Inactivation of bacteria by the plasma pencil. In: Plasma Processes and Polymers 3 (2006), Nr. 6-7, S. 470–473
- [31] GOREE, J. ; LIU, B. ; DRAKE, D.: Gas flow dependence for plasma-needle disinfection of *S. mutans* bacteria. In: Journal of Physics D-Applied Physics 39 (2006), Nr. 16, S. 3479–3486

- [32] RAHUL, R. ; STAN, O. ; RAHMAN, A. ; LITTLEFIELD, E. ; HOSHIMIYA, K. ; YALIN, A. P. ; SHARMA, A. ; PRUDEN, A. ; MOORE, C. A. ; YU, Z. ; COLLINS, G. J.: Optical and RF electrical characteristics of atmospheric pressure open-air hollow slot microplasmas and application to bacterial inactivation. In: Journal of Physics D-Applied Physics 38 (2005), Nr. 11, S. 1750–1759
- [33] POINTU, A. M. ; RICARD, A. ; DODET, N. ; ODIC, E. ; LARBRE, J. ; GANCIU, M.: Production of active species in N-2-O-2 flowing post-discharges at atmospheric pressure for sterilization. In: Journal of Physics D-Applied Physics 38 (2005), Nr. 12, S. 1905–1909
- [34] LAI, W. S. ; LAI, H. R. ; KUO, S. P. ; TARASENKO, O. ; LEVON, K.: Decontamination of biological warfare agents by a microwave plasma torch. In: Physics of Plasmas 12 (2005), Nr. 2
- [35] HERRMANN, H. W. ; HENINS, I. ; PARK, J. ; SELWYN, G. S.: Decontamination of chemical and biological warfare, (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ). In: Physics of Plasmas 6 (1999), Nr. 5, S. 2284–2289
- [36] LEI, X. ; RUI, Z. ; PENG, L. ; DING, L. L. ; ZHAN, R. J.: Sterilization of E. coli bacterium with an atmospheric pressure surface barrier discharge. In: Chinese Physics 13 (2004), Nr. 6, S. 913–917
- [37] OHKAWA, H. ; AKITSU, T. ; TSUJI, M. ; KIMURA, H. ; KOGOMA, M. ; FUKUSHIMA, K.: Pulse-modulated, high-frequency plasma sterilization at atmospheric-pressure. In: Surface & Coatings Technology 200 (2006), Nr. 20-21, S. 5829–5835
- [38] ROTH, J. R. ; SHERMAN, D. M. ; BEN GADRI, R. ; KARAKAYA, F. ; CHEN, Z. Y. ; MONTIE, T. C. ; KELLY-WINTENBERG, K. ; TSAI, P. P. Y.: A remote exposure reactor (RER) for plasma processing and sterilization by plasma active species at one atmosphere. In: IEEE Transactions on Plasma Science 28 (2000), Nr. 1, S. 56–63

- [39] KELLY-WINTENBERG, K. ; SHERMAN, D. M. ; TSAI, P. P. Y. ; BEN GADRI, R. ; KARAKAYA, F. ; CHEN, Z. Y. ; ROTH, J. R. ; MONTIE, T. C.: Air filter sterilization using a one atmosphere uniform glow discharge plasma (the Volfilter). In: IEEE Transactions on Plasma Science 28 (2000), Nr. 1, S. 64–71
- [40] LAROUSSE, M.: Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects. In: IEEE Transactions on Plasma Science 30 (2002), Nr. 4, S. 1409–1415
- [41] HERRMANN, H. W. ; SELWYN, G. S. ; HENINS, I. ; PARK, J. ; JEFFERY, M. ; WILLIAMS, J. M.: Chemical warfare agent decontamination studies in the plasma decon chamber. In: IEEE Transactions on Plasma Science 30 (2002), Nr. 4, S. 1460–1470
- [42] SOLOSHENKO, I. A. ; TSIOLKO, V. V. ; KHOMICH, V. A. ; SHCHEDRIN, A. I. ; RYABTSEV, A. V. ; BAZHENOV, V. Y. ; MIKHNO, I. L.: Sterilization of medical products in low-pressure glow discharges. In: Plasma Physics Reports 26 (2000), Nr. 9, S. 792–800
- [43] LEROUGE, S. ; WERTHEIMER, M. R. ; MARCHAND, R. ; TABRIZIAN, M. ; YAHIA, L.: Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization. In: Journal of Biomedical Materials Research 51 (2000), Nr. 1, S. 128–135
- [44] LASSEN, K. S. ; NORDBY, B. ; GRUN, R.: The dependence of the sporicidal effects on the power and pressure of RF-generated plasma processes. In: Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials 74B (2005), Nr. 1, S. 553–559
- [45] MENDIS, D. A. ; ROSENBERG, M. ; AZAM, F.: A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. In: IEEE Transactions On Plasma Science 28 (2000), Nr. 4, S. 1304–1306
- [46] LAROUSSE, M. ; MENDIS, D. A. ; ROSENBERG, M.: Plasma interaction with microbes. In: New Journal of Physics 5 (2003)

- [47] KREBS, M. C. ; BECASSE, P. ; VERJAT, D. ; DARBORD, J. C.: Gas-plasma sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. In: International Journal Of Pharmaceutics 160 (1998), Nr. 1, S. 75–81
- [48] RUTALA, W. A. ; WEBER, D. J.: Clinical effectiveness of low-temperature sterilization technologies. In: Infection Control and Hospital Epidemiology 19 (1998), Nr. 10, S. 798–804
- [49] <http://www.fda.gov/cdrh/abtox.html>. Oktober 2008
- [50] HAACKE, M. ; PIETSCH, G.J.: Some features of dielectric barrier discharges. In: 13th International Conference on Gas Discharges and their Applications, 2000, S. 267–270
- [51] PIETSCH, G. J.: Peculiarities of dielectric barrier discharges. In: Contributions to Plasma Physics 41 (2001), Nr. 6, S. 620–628
- [52] HUMPERT, C. ; PIETSCH, G.J.: Ozone synthesis in surface discharge arrangement during voltage rise. In: Proceedings of the Seventh International Symposium on High Pressure, Low Temperature Plasma Chemistry (HAKONE VII) International Symposium on High Pressure Low Temperature Plasma Chemistry, 2000, S. 334–338
- [53] RUI, Z. ; RU-JUAN, Z. ; XIAO-HUI, W.: Diagnostic of Atmospheric Pressure Surface Discharge Plasmas in Argon. In: Chin. Phys. Lett. 20 (2003), Nr. 11, S. 1988–1990
- [54] OUYANG, J. T. ; FENG, C. G. ; HUI, H. X.: A model study of the surface discharge induced plasma chemical process. In: Journal of Physics D-Applied Physics 31 (1998), Nr. 15, S. 1852–1856
- [55] GIBALOV, V. I. ; PIETSCH, G. J.: The development of dielectric barrier discharges in gas gaps and on surfaces. In: Journal of Physics D-Applied Physics 33 (2000), Nr. 20, S. 2618–2636

- [56] KOZLOV, M.V. ; SOKOLOVA, M.V. ; TEMNIKOV, A.G. ; TIMATKOV, V.V. ; VERESCHAGIN, I.P.: Surface discharge characteristics for different types of applied voltage and different dielectric materials. In: Hakone 8, 2003, S. 43–47
- [57] FINANTU-DINU, E. G. ; KORZEC, D. ; TESCHKE, M. ; ENGEMANN, J.: Influence of the electrode layout on performance of insulated surface discharge: electrical characterization. In: Surface & Coatings Technology 174 (2003), S. 524–529
- [58] TESCHKE, M. ; KORZEC, D. ; FINANJU-DINU, E. G. ; ENGEMANN, J.: Influence of electrode layout on performance of insulated surface discharge: modelling by use of PSpice. In: Surface & Coatings Technology 174 (2003), S. 541–546
- [59] KISS, E. ; MASUDA, S.: In: Modern Electrostatics: Proc. Int. Conf., 1988, S. 517
- [60] NAUDE, N. ; CAMBRONNE, J. P. ; GHERARDI, N. ; MASSINES, F.: Electrical model and analysis of the transition from an atmospheric pressure Townsend discharge to a filamentary discharge. In: Journal of Physics D-Applied Physics 38 (2005), Nr. 4, S. 530–538
- [61] ROTH, J.R.: Industrial Plasma Engineering: Volume I, Principles. Bristol and Philadelphia : Institute of Physics Publishing, 1995
- [62] BECKER, K.H. ; KOGELSCHATZ, U. ; SCHOENBACH, K.H. ; BARKER, R.J.: Non-Equilibrium Air Plasmas at Atmospheric Pressure. IoP Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia, 2005
- [63] ALEKSANDROV, N. L. ; BAZELYAN, E. M.: Ionization processes in spark discharge plasmas. In: Plasma Sources Science & Technology 8 (1999), Mai, Nr. 2, S. 285–294
- [64] PHELPS, C. T. ; GRIFFITHS, R. F.: Dependence Of Positive Corona Streamer Propagation On Air-Pressure And Water-Vapor Content. In: Journal Of Applied Physics 47 (1976), Nr. 7, S. 2929–2934

- [65] LHOEST, J.-B. ; DETRAIT, E. ; DEWEZ, J.-L. ; AGUILAR, P. van den Bosch d. ; BERTRAND, P.: A new plasma-based method to promote cell adhesion on micrometric tracks on polystyrene substrates. In: Journal of Biomaterial Science Polymer Edition 7 (1996), S. 1039–1054
- [66] DUPONT-GILLAIN, Ch.C. ; ADRIAENSEN, Y. ; DERCLAYE, S. ; ROUXHET, P.G.: Plasma-oxidized polystyrene: Wetting properties and surface reconstruction. In: Langmuir 16 (2000), S. 8194–8200
- [67] CURTIS, A.S.G. ; FORRESTER, J.V. ; MCINNES, C. ; LAWRIE, F.: Adhesion of Cells to Polystyrene Surfaces. In: The Journal of Cell Biology 97 (1983), S. 1500–1506
- [68] TSAI, W.-B. ; WEI, T.-C. ; LIN, M.-C. ; WANG, J.-Y. ; CHEN, C.-H.: The effect of radio-frequency glow discharge treatment of polystyrene on the behavior of porcine chondrocytes in-vitro. In: Journal of Biomaterial Science Polymer Edition 16 (2005), S. 699–714
- [69] ONYIRIUKA, E.C.: electron beam surface modification of polystyrene used for cell cultures. In: Journal of Adhesion and Science Technology 8 (1994), S. 1–9
- [70] SIECK, L. W. ; HERRON, J. T. ; GREEN, D. S.: Chemical kinetics database and predictive schemes for humid air plasma chemistry. Part I: Positive ion-molecule reactions. In: Plasma Chemistry And Plasma Processing 20 (2000), Nr. 2, S. 235–258
- [71] SAMOILOVICH, V. G. ; GIBALOV, V. I. ; KOZLOV, K. V.: Physical Chemistry of the Barrier Discharge. Bd. 2. DVS Media GmbH, 1997
- [72] HERRON, J. T. ; GREEN, D. S.: Chemical kinetics database and predictive schemes for nonthermal humid air plasma chemistry. Part II. Neutral species reactions. In: Plasma Chemistry And Plasma Processing 21 (2001), September, Nr. 3, S. 459–481

- [73] ELIASSON, B. ; KOGELSCHATZ, U.: Modeling and Applications of Silent Discharge Plasmas. In: IEEE Transactions on Plasma Science 19 (1991), Nr. 2, S. 309–323
- [74] SOLOSHENKO, I. A. ; TSIOLKO, V. V. ; POGULAY, S. S. ; KALYUZHNYAYA, A. G. ; BAZHENOV, V. Y. ; SHCHEDRIN, A. I.: Effect of water adding on kinetics of barrier discharge in air. In: Plasma Sources Science & Technology 18 (2009), Nr. 4, S. 045019
- [75] ONO, R. ; ODA, T.: Dynamics of ozone and OH radicals generated by pulsed corona discharge in humid-air flow reactor measured by laser spectroscopy. In: Journal of Applied Physics 93 (2003), Nr. 10, S. 5876–5882
- [76] MAGNE, L. ; PASQUIERS, S. ; BLIN-SIMIAND, N. ; POSTEL, C.: Production and reactivity of the hydroxyl radical in homogeneous high pressure plasmas of atmospheric gases containing traces of light olefins. In: Journal of Physics D-Applied Physics 40 (2007), Nr. 10, S. 3112–3127
- [77] ONO, R. ; ODA, T.: OH radical measurement in a pulsed arc discharge plasma observed by a LIF method. In: IEEE Transactions on Industry Applications 37 (2001), Nr. 3, S. 709–714
- [78] KOCIK, M. ; MIZERACZYK, J. ; KANAZAWA, S. ; OHKUBO, T.: LIF observation of ground-state OH radicals in DC nozzle-to-plane positive streamer corona. In: Journal of Advanced Oxidation Technologies 9 (2006), Nr. 2, S. 144–149
- [79] KANAZAWA, S. ; TANAKA, H. ; KAJIWARA, A. ; OHKUBO, T. ; NOMOTO, Y. ; KOCIK, M. ; MIZERACZYK, J. ; CHANG, J. S.: LIF imaging of OH radicals in DC positive streamer coronas. In: Thin Solid Films 515 (2007), Nr. 9, S. 4266–4271
- [80] DILECCE, G. ; AMBRICO, P. F. ; SIMEK, M. ; DE BENEDICTIS, S.: New laser-induced fluorescence scheme for simultaneous OH and NO detection by a single laser set-up. In: Applied Physics B-Lasers and Optics 75 (2002), Nr. 1, S. 131–135

- [81] KUZUYA, M. ; KONDO, S. ; SUGITO, M. ; YAMASHIRO, T.: Peroxy radical formation from plasma-induced surface radicals of polyethylene as studied by electron spin resonance. In: Macromolecules 31 (1998), Nr. 10, S. 3230–3234
- [82] RANBY, B. ; LUCKI, J.: New aspects of photodegradation and photo-oxidation of polystyrene. In: Pure and Applied Chemistry 52 (1980), S. 295–303
- [83] MURAKAMI, T. N. ; FUKUSHIMA, Y. ; HIRANO, Y. ; TOKUOKA, Y. ; TAKAHASHI, M. ; KAWASHIMA, N.: Modification of PS films by combined treatment of ozone aeration and UV irradiation in aqueous ammonia solution for the introduction of amine and amide groups on their surface. In: Applied Surface Science 249 (2005), Nr. 1-4, S. 425–432
- [84] LIU, S. H. ; NEIGER, M.: Electrical modelling of homogeneous dielectric barrier discharges under an arbitrary excitation voltage. In: Journal of Physics D-Applied Physics 36 (2003), Nr. 24, S. 3144–3150
- [85] 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), Nr. 5, S. 817–825
- [86] MANLEY, T. C.: The electrical characteristics of the ozonator discharge. In: Transactions of the Electrochemical Society 84 (1943), S. 83–96
- [87] SIMEK, M. ; CLUPEK, M. ; BABICKY, V. ; SUNKA, P.: Production of reactive species by atmospheric pressure streamers in N-2-O-2 mixtures. In: Pure and Applied Chemistry 78 (2006), Nr. 6, S. 1213–1225
- [88] Spectral database for organic compounds (SDBS)
- [89] LIN-VIEN, D. ; COLTHUP, N.B. ; FATALEY, W.G. ; GRASELLI, J.G.: The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of organic Molecules. Academic Press, 1991

- [90] PASCUAL, M. ; SANCHIS, R. ; SÁNCHEZ, L. ; GARCIA, D. ; BALART, R.: Surface Modification of Low Density Polyethylene (LDPE) Film Using Corona Discharge Plasma for Tecnological Applications. In: Journal of Adhesion Science and Technology 22 (2008), S. 1425–1442
- [91] SOCRATES, G.: Infrared Characteristic Group Frequencies. John Wiley & Sons Ltd., 1994
- [92] FOWKES, F. M.: Attractive Forces At Interfaces. In: Industrial And Engineering Chemistry 56 (1964), Nr. 12, S. 40
- [93] <http://www.kruss.de/index.php?content=http%3A/www.kruss.de/-messtechnik/kontaktwinkelde.html>. Oktober 2008
- [94] MUNK, K.: Grundstudium Biologie: Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2000
- [95] MICHAL, G.: Biochemical Pathways = Biochemie-Atlas. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 1999
- [96] RIESENMAN, P. J. ; NICHOLSON, W. L.: Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. In: Applied and Environmental Microbiology 66 (2000), Nr. 2, S. 620–626
- [97] 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 64 (2000), Nr. 3, S. 548–
- [98] DRIKS, A.: *Bacillus subtilis* spore coat. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews 63 (1999), Nr. 1, S. 1–
- [99] SETLOW, P.: Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. In: Journal Of Applied Microbiology 101 (2006), September, Nr. 3, S. 514–525

- [100] WALKER, H. W. ; MATCHES, J. R. ; AYRES, J. C.: Chemical Composition And Heat Resistance Of Some Aerobic Bacterial Spores. In: Journal Of Bacteriology 82 (1961), Nr. 6, S. 960–
- [101] PANDEY, N. K. ; ARONSON, A. I.: Properties Of The Bacillus-Subtilis Spore Coat. In: Journal Of Bacteriology 137 (1979), Nr. 3, S. 1208–1218
- [102] BAYLISS, C. E. ; WAITES, W. M. ; KING, N. R.: Resistance And Structure Of Spores Of Bacillus-Subtilis. In: Journal Of Applied Bacteriology 50 (1981), Nr. 2, S. 379–390
- [103] PALOP, A. ; SALA, F. J. ; CONDON, S.: Heat resistance of native and de-mineralized spores of Bacillus subtilis sporulated at different temperatures. In: Applied And Environmental Microbiology 65 (1999), S. 1316–1319
- [104] MUNOZ, L. ; SADAIE, Y. ; DOI, R. H.: Spore Coat Protein Of Bacillus-Subtilis - Structure And Precursor Synthesis. In: Journal Of Biological Chemistry 253 (1978), Nr. 19, S. 6694–6701
- [105] PENDUKAR, S. H. ; KULKARNI, P. R.: Chemical-Composition Of Bacillus Spores. In: Nahrung-Food 32 (1988), Nr. 10, S. 1003–1004
- [106] FRIEDMAN, C. A. ; HENRY, B. S.: Bound water content of vegetative and spore forms of bacteria. In: Journal Of Bacteriology 36 (1938), Nr. 1, S. 99–105
- [107] SCHMITZ, S.: Der Experimentator: Zellkultur. Bd. 2. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009
- [108] WELTMANN, K. D. ; KINDEL, E. ; BRANDENBURG, R. ; MEYER, C. ; BUSSIAHN, R. ; WILKE, C. ; WOEDTKE, T. von: Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation. In: Contributions To Plasma Physics 49 (2009), Nr. 9, S. 631–640
- [109] OEHMIGEN, K. ; HÄHNEL, M. ; BRANDENBURG, R. ; WILKE, Ch. ; WELTMANN, K.-D. ; WOEDTKE, Th. von: The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. In: Plasma Processes and Polymers 7 (2009), S. 250–257

- [110] CVELBAR, U. ; VUJOSEVIC, D. ; VRATNICA, Z. ; MOZETIC, M.: The influence of substrate material on bacteria sterilization in an oxygen plasma glow discharge. In: Journal of Physics D-Applied Physics 39 (2006), Nr. 16, S. 3487–3493
- [111] LAROUSSE, M. ; RICHARDSON, J. P. ; DOBBS, F. C.: Effects of nonequilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology. In: Applied Physics Letters 81 (2002), Nr. 4, S. 772–774
- [112] MOISAN, M. ; BARBEAU, J. ; CREVIER, M. C. ; PELLETIER, J. ; PHILIP, N. ; SAOUDI, B.: Plasma sterilization. Methods mechanisms. In: Pure and Applied Chemistry 74 (2002), Nr. 3, S. 349–358
- [113] LIM, J. P. ; UHM, H. S. ; LI, S. Z.: Influence of oxygen in atmospheric-pressure argon plasma jet on sterilization of *Bacillus atrophaeus* spores. In: Physics of Plasmas 14 (2007), Nr. 9, S. –
- [114] KUO, SP ; TARASENKO, O ; NOURKBASH, S ; BAKHTINA, A ; LEVON, K: Plasma effects on bacterial spores in a wet environment. In: New Journal of Physics 8 (2006). – ISSN 1367–2630
- [115] HÄHNEL, M. ; PETERS, S. ; WELTMANN, K.-D.: Morphological changes of *Bacillus atrophaeus* spores by atmospheric pressure plasma treatment in moistured air. In: eingereicht bei Plasma Processes and Polymers
- [116] Society for Biomolecular Screening (SBS): ANSI/SBS 4-2004, for Microplates – Well Positions. American National Standards Institute, 2006
- [117] MASUDA, S. ; AKUTSU, K. ; KURODA, M. ; AWATSU, Y. ; SHIBUYA, Y.: A Ceramic-Based Ozonizer Using High-Frequency Discharge. In: IEEE Transactions on Industry Applications 24 (1988), Nr. 2, S. 223–231
- [118] HÄHNEL, M. ; DIENER, A. ; KOLUKISA OGLU, Ü. ; WELTMANN, K.-D. ; THUROW, K.: The influence on cell growth properties in different microtiterplate types by corona-dielectric barrier discharge plasma at atmospheric pressure. In: eingereicht bei Plasma Processes and Polymers

- [119] Betriebsanleitung Impulsspannungsquelle 20 kV. : Betriebsanleitung Impulsspannungsquelle 20 kV. Ingenieurbüro Dr. Jürgen Klein, von-Broich-Straße 5 52072 Aachen, September 2004

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Betreuern Frau Prof. Thurow und Herrn Prof. Weltmann für das herausfordernde Thema und der konstruktiven Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Auch gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des *INP Greifswald e.V.* und des *Center for Life Science Automation* in Warnemünde, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

DANKE

Thesen

1. Physikalische Atmosphärendruckplasmen bieten die Chance, dreidimensionale Diagnostikprodukte aus thermolabilen Kunststoffen für High Throughput und High Content Screening Verfahren, antimikrobiell zu behandeln und helfen so, kostenintensive Reinraumfläche zu reduzieren und die Zuverlässigkeit der Diagnostik zu erhöhen.
2. Der Erfolg der Behandlung ist stark von der relativen Luftfeuchtigkeit des Prozessgases abhängig. In zweidimensionalen Voruntersuchungen wurde mit Ansteigen der relativen Luftfeuchtigkeit eine verstärkte Abtötung der Mikroorganismen gemessen. Weiterhin stieg, die Abtötungsrate der Mikroorganismen mit steigender Behandlungszeit und Plasmaleistung an. Für einen Abstand zwischen Elektrode und den ebenen Substraten von $0,6\text{ mm}$ war eine Reduktion von mehr als vier Log-Stufen an Bakteriensporen innerhalb von $2,5\text{ min}$ möglich.
3. Die antimikrobielle Wirkung wird maßgeblich auf Hydroxylradikale zurückgeführt. Die Konzentration der Hydroxylradikale nimmt mit steigender relativen Luftfeuchtigkeit zu.
4. Es konnte keine Emission von angeregten Hydroxylradikalen gemessen werden. Als Ursache für das Fehlen dieser Emissionslinien sind die im Vergleich zu anderen Plasmen sehr geringe Plasmaleistung und ein kleines Beobachtungsvolumen zu nennen.
5. Für den Bereich zwischen 300 nm und 400 nm konnten deutlich die Linien des 2. positiven Stickstoffsystems gemessen werden. Unterhalb von 300 nm

traten jedoch keine nennenswerten Emissionen auf, weshalb der antimikrobielle Effekt nicht auf die Wirkung von UV-Photonen zurückzuführen ist.

6. Ozon kann als Hauptgrund für die antimikrobielle Wirkung ausgeschlossen werden, da dieses durch einen steigenden Feuchtigkeitsgehalt des Prozessgases vermindert wird.
7. Die Bakteriensporen konnten, entsprechend der Behandlungszeit, teilweise oder vollständig durch das Plasma abgetragen werden, was mittels eines Rasterkraftmikroskops untersucht wurde. Erst oberhalb von 50 % relativer Luftfeuchte war innerhalb von fünf Minuten ein signifikanter Abtrag erkennbar.
8. Mittels FTIR konnte eine Oxidation der Polystyroloberflächen belegt werden, welche mit einer deutlichen Erhöhung des polaren Anteils der Oberflächenenergie einher ging, nachgewiesen durch Kontaktwinkelmessungen. Der Behandlungseffekt nahm mit steigendem Abstand der Probe zur Elektrode ab und zeigte für feuchte Prozessgase nur geringe Abhängigkeiten von der relativen Luftfeuchtigkeit.
9. Aus den in den Voruntersuchungen gewonnenen Erkenntnissen wurden zwei verschiedene Plasmaanordnungen aufgebaut und charakterisiert. Das erste der beiden Systeme ist eine dreidimensionale Oberflächen-DBE, bei der beide Elektroden und das Dielektrikum in einer Art von Finger vereinigt sind. Das zweite System ist eine Korona-DBE, bestehend aus zwei räumlich getrennten Elektroden und der Wellplatte als Dielektrikum, bei der sich das Plasma im Volumen ausbildet.
10. Beide Systeme sind in ihren lateralen Abmaßen nicht größer als typische automatisierte Laborposition, wodurch eine gute Integrationsfähigkeit in bestehende automatisierte Labor- und Analysensysteme gegeben ist.
11. Die für den Prozess und die Prozessüberwachung notwendige Peripherie sowie die Schnittstellen zu einem Steuerungs- und Überwachungscomputer wurden definiert. Weiterhin wurde ein genauer Ablauf für die Prozessführung entworfen.

12. Es können mit beiden Systemen bei 70 % relativer Luftfeuchtigkeit mehr als vier Log-Stufen an Sporen von *Bac. atrophaeus* innerhalb von 60 s abgetötet werden. Die in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse sind damit auch bei der Behandlung von Multiwellplatten gültig. Die Keimabtötung ist abhängig von der relativen Luftfeuchtigkeit. Die dazu notwendige mittlere Plasmaleistung beträgt für eine komplette Multititerplatte ca. 6 W für die Plasmafinger und weniger als 4 W im Fall der Korona-DBE.
13. Für die verschiedensten Behandlungsparameter konnten mittels XTT Test nur geringe Abweichungen der Zellvitalität im Vergleich zu einer unbehandelten Zellkulturplatte festgestellt werden. Das unveränderte Zellwachstum wurde auch anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigt.
14. Durch die Plasmabehandlungen wurden die Oberflächeneigenschaften von nativen und nicht für Zellkultur vorbereiteten Multiwellplatten in der Form verändert, dass sie mit Zellkulturplatten vergleichbare Werte erhielten.
15. Mit den entwickelten Plasmasystemen und Prozessabläufen ist in einer Taktzeit von zwei Minuten eine keimreduzierende Behandlung um mehr als vier Größenordnungen von 96er Multiwellplatten in feuchter Luft möglich.