

Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (MAT)

Abstract

In the recent past, the antimicrobial applicability of tissue tolerable plasma (TTP) has been examined, and is increasing in importance. Many different plasma sources can be used medically. In order to obtain reliable test results by using plasma sources, it is essential not only to assess physical parameters but also to screen a use-oriented application of plasma sources. It is necessary to both determine the biological efficacy and establish uniform coverage of the treated surfaces. This article shows a simple screening method for this. We used newly inoculated agar plates with bacterial test organisms and treated the agar plates with two surface barrier discharged (SDB) plasmas. The carrier gas was argon and air.

Keywords: Tissue Tolerable Plasma (TTP), barrier discharge sources, SBD, quality screening, microorganism-agar test (MAT), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*

Rutger Matthes¹
Nils-Olaf Hübner¹
Claudia Bender¹
Ina Koban²
Klaus-Dieter
Weltmann³
Axel Kramer¹

1 Institute for Hygiene and Environmental Medicine, University of Greifswald, Germany

2 Unit of Periodontology, Dental School, University of Greifswald, Greifswald, Germany

3 Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP), Greifswald, Germany

Introduction

Physical plasmas have been used as an alternative method for sterilization in the medical field for more than a decade [1], [2]. Recently, the applications of tissue tolerable plasma (TTP) on body surfaces have become more important, especially for the treatment of chronic wounds [3], [4], [5]. For medical use, different types of TTP can be selected; a review of plasma sources is described by Kong et al. [6] and Weltmann et al. [7]. Not only plasma jets but also dielectric barrier (DB) plasmas are suitable for wound treatment. SBDs are especially suitable for the treatment of larger surfaces, because the plasma is produced over the entire area. Plasma jets are suitable for treating punctiform areas and can be applied flexibly through tubes.

The effectiveness of plasma sources can vary greatly. The number of application forms alone or options to modulate the output (e.g., parameters of frequency, voltage) of a plasma source provide a versatile range of plasma effects. There are also less obvious influences which modulate the effects. Even plasma sources with identical technical parameters can produce variable

physicochemical effects on biological systems within the same series of trials. The cause may be variations of the temperature, altered production of radical species, or inconstant intensity of UV radiation. In order to obtain reliable test information about the efficacy of plasma sources, it would be helpful to have a simple screening test that documents the constancy and even distribution plasma on areas exposed to it. Microorganisms cultured on nutrient agar plates are the logical choice as the test object.

To test the anti-biofilm activity of plasma, microorganisms must attach to surfaces and, under suitable conditions, develop into a biofilm. After treating the biofilm with plasma, the microorganisms are removed from the surfaces and put into suspension [8]; however, this does not directly demonstrate the constancy and uniformity of plasma effects. The same is true of applying plasma to inhomogeneous surfaces such as wound tissue, where irregular effects may be attributed to the inhomogeneous structure of the surface.

This article examines the suitability of the microorganism agar test (MAT) as a screening method for surface barrier discharged (SBD) plasma sources to determine the homo-

generality of their effects. The tests were carried out with two different SBD plasma sources.

Method

Germ suspension

The bacterial strains used for the tests, *Pseudomonas aeruginosa* SG81 and *Staphylococcus epidermidis* RP62A, produce biofilms. *Pseudomonas aeruginosa* SG81 (*P. aeruginosa*) was isolated out of a technical water system and has been well characterized [9]. *Staphylococcus epidermidis* RP62A (*S. epidermidis*) is used by many researchers as a biofilm-producing reference strain [10], [11], [12], [13].

A glass bead with attached bacteria of the test strain was transferred onto a blood agar plate (Columbia Agar + 5% sheep blood, bioMérieux, Nürtingen, Germany) under aseptic conditions to prepare the first subculture. This was incubated for 24 h at 37 °C. From this, further subcultures were started on new blood agar plates and incubated for 24 h at 37 °C. Afterwards, the grown colonies were rinsed off into a test tube and washed 3 times with phosphate buffered saline solution (PBS) by centrifugation at 2500 rpm for 15 min each time. Between the washing steps, the supernatant liquid was decanted. The remaining pellets were each resuspended in 10 ml of PBS. A serial dilution was prepared to yield an end concentration of the bacterial suspension of 10^5 colony forming units (CFU)/ml.

Test preparation

Petri dishes with diameters of 55 mm (TPP, Trasadingen, Switzerland) and 96 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were prepared with CASO agar (Roth, Karlsruhe, Germany). Next, the prepared bacterial suspension was spread with a sterile cotton swab over the agar. A drying time of 30 min was maintained to provide uniformly dry agar plates for the subsequent plasma treatment. The plasma-treated bacteria were incubated for 24 h (*P. aeruginosa*) and 48 h (*S. epidermidis*) at 37 °C.

Plasma treatment

Two different SBD electrodes were screened. Plasma source A had the following parameters: $U_{pp} = 4$ kV, 30 kHz, pulsed 250 ms on-time, 750 ms off-time, argon gas flow 5 standard liters/min (slm). The parameters of plasma source B were: $U_{pp} = 3$ kV, 40 kHz, pulsed 250 ms on-time, 750 ms off-time, argon gas flow 0.5 slm (both sources were developed by the Leibniz Institute for Plasma Science and Technology e.V. Greifswald, Germany).

The plates were treated for 30 s, 60 s and 120 s by plasma source A, and for 60 s to 6 min by plasma source B. The distance between the electrodes and the agar was 2 mm. Before starting the argon plasma treatment, the

treatment area was shielded to exclude influences from the environment and the space between the electrode and the agar surface was “rinsed” with argon for 1 min.

Results

The area of the agar plates treated by argon plasma source A (gas flow 5 slm) was approximately 12 cm² (Figure 1 and Figure 2). Bacterial growth decreased with increased duration of plasma exposure. However, in the center of the treatment area, *P. aeruginosa* (Figure 1) and *S. epidermidis* (Figure 2) retained their ability to form colonies.

Agar plates air treated (without gas flow) with plasma source A are shown in Figure 3 and Figure 4. After 30 s of plasma treatment, distinct inactivation of *P. aeruginosa* (Figure 3) and *S. epidermidis* (Figure 4) was observed. Viable bacteria were still visible in the upper right plasma treated area after 30 s of treatment. The edges on the right side of the plasma treated area appeared much more irregular.

Figure 5 shows agar plates bearing cultures of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* treated with argon plasma from source B (gas flow 0.5 slm). The plasma-treated area was a circle of approximately 10 cm². Both agar plates in Figure 5 were fully covered with biofilm growth. Agar plates with *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* after an identical air plasma treatment (without gas flow) are shown in Figure 6 and Figure 7. On the left, obvious bacterial growth on agar was evident, while only some colonies were visible on the agar plate on the right after identical durations of plasma treatment.

Discussion

The treatment of bacteria spread on culture medium is a simple test, often used to test the antimicrobial efficacy of plasma sources, for example in Pompl et al. [14], Laroussi et al. [15], Shimizu et al. [16] and Morfill et al. [17]. The MAT is also a practical means of obtaining information about the quality of the plasma treatment in terms of stability and homogeneity.

An inactivation zone is visible inside the treated area (Figure 1, Figure 2, plasma source A), and becomes more distinct with longer treatment durations. However, a vital zone persists in the center of the treated area, independent of the length of plasma exposure. In contrast, this phenomenon is not visible in Figure 3 and Figure 4 despite the fact that the same plasma source (A) was used. Nevertheless, all figures show that the right edge of the treated area exhibits fringes. The difference between the two plasma applications was the carrier gas used: in Figure 1 and Figure 2, the agar plates were treated with argon plasma and in Figure 3 and Figure 4 with air plasma. An influence of the ambient air on the argon plasma can be excluded, because the treatment was shielded. An irregular spread of the reactive “after glow”

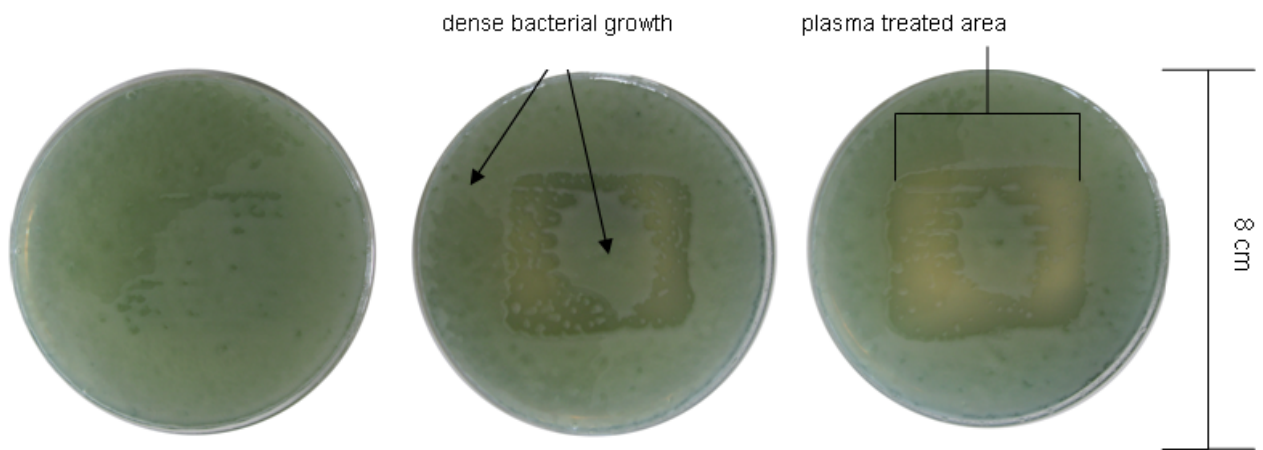


Figure 1: Plasma source A, argon, treatment duration from left to right 30 s, 60 s, 120 s, *Pseudomonas aeruginosa* SG81

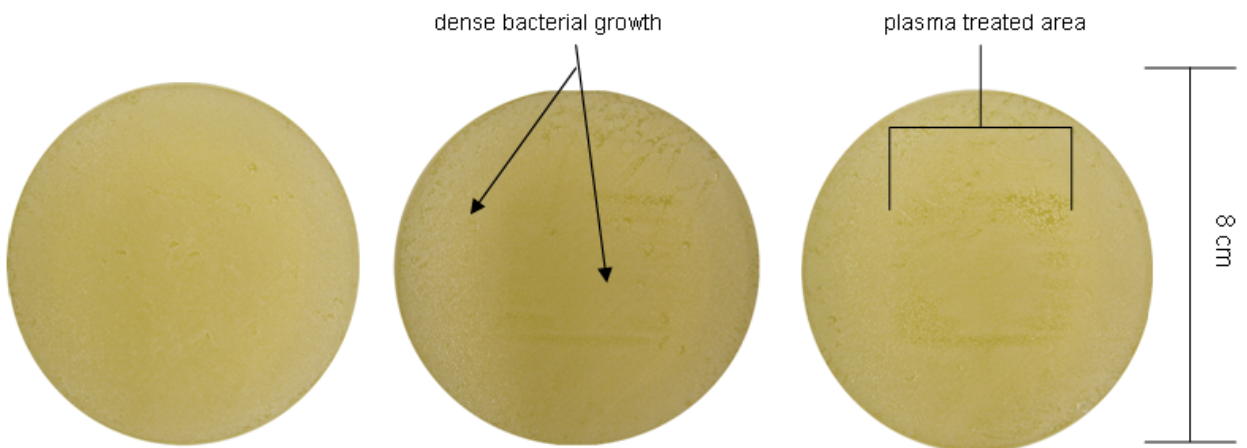


Figure 2: Plasma source A, argon, treatment duration from left to right 30 s, 60 s, 120 s, *Staphylococcus epidermidis* RP62A

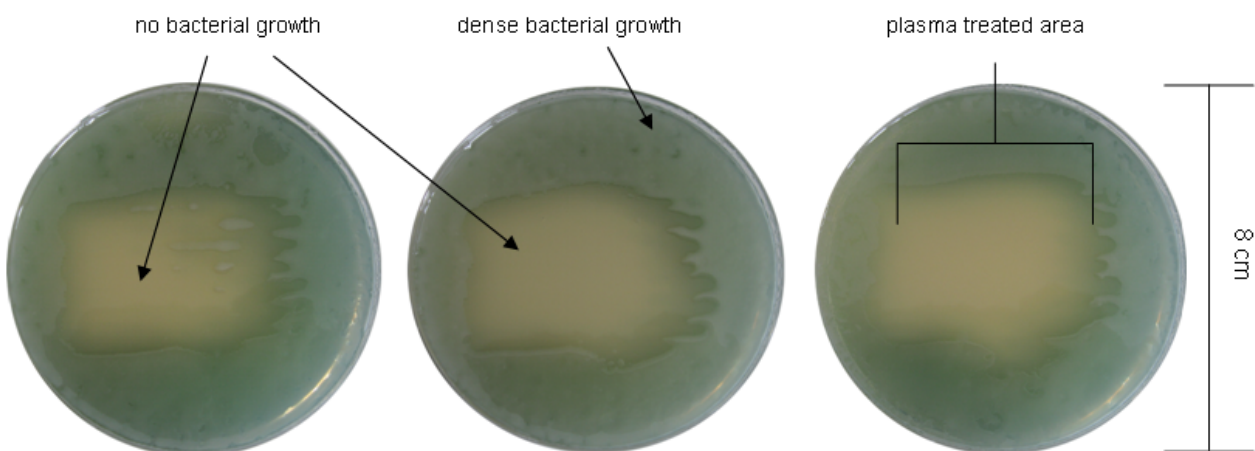


Figure 3: Plasma source A, air, treatment duration from left to right 30 s, 60 s, 120 s, *Pseudomonas aeruginosa* SG81

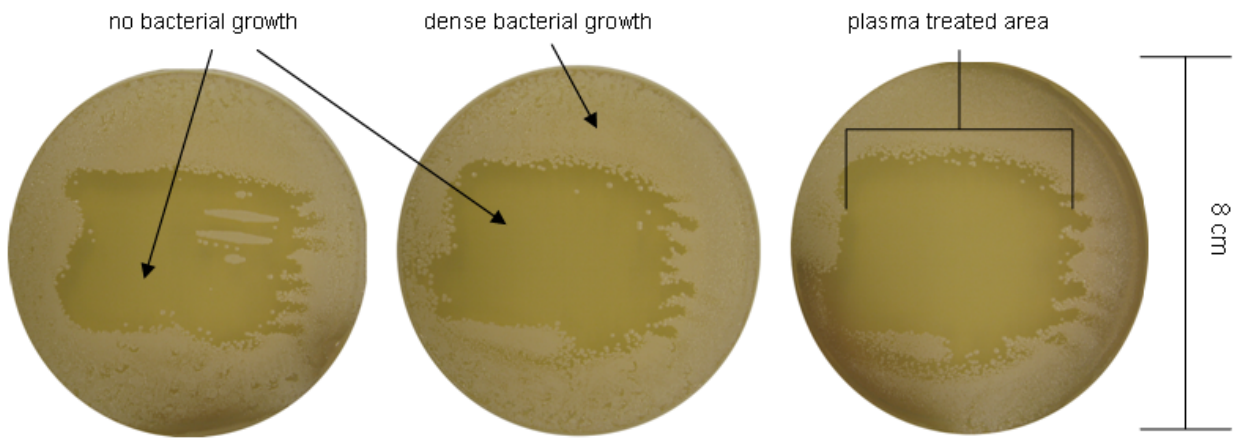


Figure 4: Plasma source A, air plasma, treatment duration from left to right 30 s, 60 s, 120 s, *Staphylococcus epidermidis* RP62A



Figure 5: Plasma source B, argon plasma, treatment duration 6 min, *Pseudomonas aeruginosa* SG81 (left, dense growth) and *Staphylococcus epidermidis* RP62A (right, dense growth)



Figure 6: Plasma source B, air plasma, treatment duration 1 min, *Pseudomonas aeruginosa* SG81

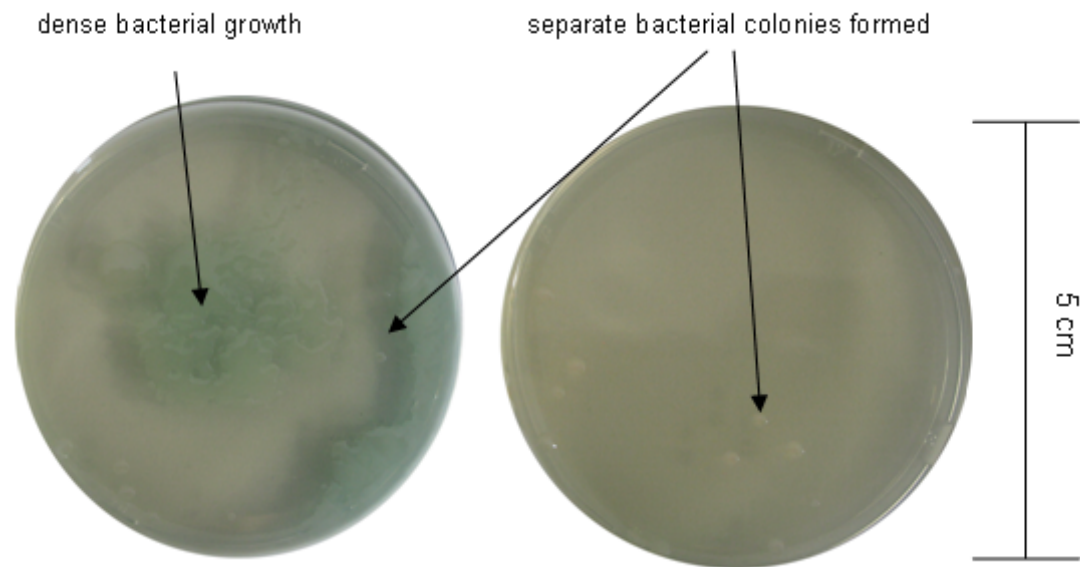


Figure 7: Plasma source B, air plasma, treatment duration 2 min, *Pseudomonas aeruginosa* SG81

under the electrode area is postulated for the results shown in Figure 1 and Figure 2. Additionally, comparing the two bacterial strains, it is apparent that *S. epidermidis* is less sensitive to argon plasma than is *P. aeruginosa*, because more colonies of the former were formed after the same treatment duration.

Figure 5 shows *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* after 6 min of plasma treatment by plasma source B. No inactivation was observable; the culture medium is fully covered with biofilm growth. The results of plasma source A, which showed an antimicrobial effect after just 30 s of plasma exposure, make it clear that the biological effect of a particular plasma type (here SBD) depends on the design and the input power per treated area of the source. An input power threshold value may exist for an antimicrobial effect of argon plasma. It is interesting that the different sensitivity of the two bacterial strains to argon plasma was not observable after treatment with air plasma (Figure 3 and Figure 4).

The effect on *P. aeruginosa* is quite evident in Figure 6 and Figure 7. The inactivation of that bacterial species is different in Figure 6 and Figure 7, although they were subjected to the same treatment. Several identical plasma source B devices were available, so that two parallel plasma treatments of different dishes were possible.

The results with *S. epidermidis* are not presented, because after 1 min of treatment with air plasma, no growth was visible. It is conceivable that *S. epidermidis* is more sensitive to air plasma than is *P. aeruginosa*.

The results of our study showed that variations in antimicrobial efficacy could be caused by small differences in the design of a plasma application and even between two identical devices. For this reason, our laboratory intends to routinely perform the screening method MAT before testing special medical plasma applications.

The MAT is useful for all plasma applications which are not restricted to demonstrating the antimicrobial effect

of a particular source/device. Examples are treatments of liquids, biofilms, cell cultures, or surfaces.

The light emission of the produced plasma is often only visually assessed. Not only ambient factors (i.e., room temperature, air humidity, oxygen content) can influence the uniformity of plasma efficacy, but also certain unidentified technical factors inherent in the equipment itself (i.e., the spread of "after glow") can play a role.

In order to employ the MAT reliably, the microorganisms must be spread evenly over the agar plate; this prevents gross variations in microorganism density. The agar surface must be flat and horizontal to ensure a constant distance to the SBD electrode.

Conclusion

Pre-tests of the plasma source are advised to avoid misinterpretations; this is especially important for plasma sources which are still in the developmental stage. The MAT is a helpful tool to observe the quality and efficacy of SBD plasma sources. That screening method requires at least 24 h to assess the quality of stability and homogeneity for using new plasma sources.

Acknowledgements

This work was realized as part of the multidisciplinary cooperative research project 'Campus PlasmaMed' within the program 'PlasmaCure'. This work was supported by a grant from the German Ministry of Education and Research (BMBF, grant No. 13N9779).

References

1. Höller C, Martiny H, Christiansen B, Rügen H, Gundermann KO. The efficacy of low temperature plasma (LTP) sterilization, a new sterilization technique. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1993;194(4):380-91.
2. Chau TT, Kao KC, Blank G, Madrid F. Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. *Biomaterials.* 1996;17(13):1273-7. DOI: 10.1016/S0142-9612(96)80003-2
3. Kramer A, Lindequist U, Weltmann KD, Wilke C, von Woedtke T. Plasma Medicine – its perspective for wound therapy. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2008;3(1):Doc16. Available from: <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2008-3/dgkh000114.shtml>
4. Weltmann KD, von Woedtke T, Brandenburg R, Ehlbeck J. Biomedical applications of atmospheric pressure plasma. II Central European Symposium on Plasma Chemistry 2008. *Chem Listy.* 2008;102:s1450-s1451. Available from: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_16_s1450-s1451.pdf
5. Lloyd G, Friedman G, Jafri S, Schultz G, Fridman A, Harding K. Gas Plasma: Medical Uses and Developments in Wound Care. *Plasma Process Polym.* 2010;7:194-211. DOI: 10.1002/ppap.200900097
6. Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, van Dijk J, Zimmermann JL. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phys.* 2009;11:115012. DOI: 10.1088/1367-2630/11/11/115012
7. Weltmann KD, Kinde E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure Appl Chem.* 2010;82(6):1223-37. DOI: 10.1351/PAC-CON-09-10-35
8. Koban I, et al. Killing and removal of dental biofilms from titanium implant surfaces. In: *BMT 2010. (BMT 2010 Reguläre Beiträge).* Rostock-Warnemünde, Germany; 2010.
9. Grobe S, Wingender J, Trüper HG. Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J Appl Bacteriol.* 1995;79(1):94-102.
10. Christensen GD, Barker LP, Mawhinney TP, Baddour LM, Simpson WA. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 1990;58(9):2906-11.
11. Anglen J, Apostoles PS, Christensen G, Gainor B, Lane J. Removal of surface bacteria by irrigation. *J Orthop Res.* 1996;14(2):251-4. DOI: 10.1002/jor.1100140213
12. Sadvokaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun.* 2005;73(5):3007-17. DOI: 10.1128/IAI.73.5.3007-3017.2005
13. König DP, Perdreau-Remington F, Rütt J, Stossberger P, Hilgers RD, Plum G. Slime production of *Staphylococcus epidermidis*: increased bacterial adherence and accumulation onto pure titanium. *Acta Orthop Scand.* 1998;69(5):523-6. DOI: 10.3109/17453679808997791
14. Pompl R, et al. The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging. *New J Phys.* 2009;11:115023. DOI: 10.1088/1367-2630/11/11/115023
15. Laroussi M, Tendero C, Lu X, Alla S, Hynes WL. Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil. *Plasma Process Polym.* 2006;3(6-7):470-3. DOI: 10.1002/ppap.200600005
16. Shimizu T, Steffes B, Pompl R, Jamitzky F, Bunk W, Ramrath K, et al. Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination. *Plasma Process Polym.* 2008;5(6):577-82. DOI: 10.1002/ppap.200800021
17. Morfill GE, Shimizu T, Steffes B, Schmidt HU. Nosocomial infections-a new approach towards preventive medicine using plasmas. *New J Phys.* 2009;11:115019. DOI: 10.1088/1367-2630/11/11/115019

Corresponding author:

Dipl. Hum. biol. Rutger Matthes
 Institute for Hygiene and Environmental Medicine,
 Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald,
 Walther-Rathenau-Straße 49a, 17487 Greifswald,
 Germany
rutger.matthes@uni-greifswald.de

Please cite as

Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Weltmann KD, Kramer A. Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (MAT). *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2010;5(2):Doc02. DOI: 10.3205/dgkh000145, URN: urn:nbn:de:0183-dgkh0001458

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2010-5/dgkh000145.shtml>

Published: 2010-09-21

Copyright

©2010 Matthes et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.en>). You are free: to Share – to copy, distribute and transmit the work, provided the original author and source are credited.

Screeningmethode zur Qualitätsprüfung flächiger Plasmaquellen mit dem Mikroorganismen-Agar-Test (MAT)

Zusammenfassung

In jüngster Zeit gewinnt die Anwendbarkeit von gewebeverträglichem Plasma (Tissue Tolerable Plasma – TTP) auf der Körperoberfläche u.a. zur Wundbehandlung an Bedeutung. Hierfür kommt eine Vielzahl verschiedener Plasmaquellen in Frage. Um verlässliche Untersuchungsergebnisse beim Einsatz von Plasmaquellen zu gewährleisten, muss neben der Bestimmung der physikalischen Parameter zuvor ein anwendungsbezogenes Screening der Plasmaquellen erfolgen, um nicht nur deren Effekte auf biologische Systeme, sondern auch um eine homogene Plasmawirkung auf den zu behandelnden Oberflächen zu bestimmen. In dieser Arbeit wird hierfür als einfache Screeningmöglichkeit die Exposition frisch beimpfter Agarplatten mit Testbakterien anhand von zwei Oberflächen-Barriere-Entladungen (surface barrier discharged – SBD)-Plasmen mit Argon und Luft als Trägergas vorgestellt.

Schlüsselwörter: Tissue Tolerable Plasma (TTP), Dielektrische Barriere-Entladung, DBE, SBD, Qualitätsscreening, Mikroorganismen-Agar-Test (MAT), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*

Einleitung

Bereits seit Längerem werden physikalische Plasmen als alternative Sterilisationsverfahren im medizinischen Bereich eingesetzt [1], [2]. Neuerdings gewinnt die Anwendung von gewebeverträglichem Plasma (Tissue Tolerable Plasma – TTP) auf der Körperoberfläche mit dem Schwerpunkt der Wundbehandlung zunehmende Bedeutung [3], [4], [5]. Zur medizinischen Nutzung stehen verschiedene Formen von TTP zur Auswahl. Eine Auswahl an Plasmaquellen für den medizinischen Bereich wird bei Kong et al. [6] sowie Weltmann et al. [7] beschrieben. Zur Wundbehandlung eignen sich sowohl Plasma-Jets als auch Barriere-Entladungs-Plasmen (BD). Oberflächen-Barriere-Entladungs-Plasmen (Surface barrier discharge – SBD) eignen sich speziell zur Behandlung von größeren Oberflächen, da das Plasma über eine Fläche verteilt erzeugt wird. Plasma-Jets bieten eine punktförmige Behandlungsfläche und können z.T. flexibel über Schlauchsysteme geleitet werden.

Rutger Matthes¹
Nils-Olaf Hübner¹
Claudia Bender¹
Ina Koban²
Klaus-Dieter
Weltmann³
Axel Kramer¹

1 Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland

2 Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Greifswald, Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald, Deutschland

3 Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V., Greifswald, Deutschland

Die Wirkungsweise von Plasmaquellen kann stark variieren. Allein durch die verschiedenen Applikationsformen oder Modulationsmöglichkeiten (technische Parameter wie Frequenz, Spannung) einer Plasmaquelle sind vielfältige Wirkspektren möglich. Es gibt aber auch schwer ersichtliche Einflüsse auf die Wirkungsweise. Selbst Plasmaquellen mit identischen technischen Parametern können innerhalb einer Versuchsreihe eine veränderte physikochemische Wirkung auf biologische Systeme entfalten. Mögliche Ursachen sind z.B. Temperaturschwankungen, veränderte Radikalbildung oder eine ungleichmäßige Intensität der UV-Strahlung. Um verlässliche Untersuchungsergebnisse der Wirksamkeit von Plasmaquellen zu gewährleisten, wäre es hilfreich, über einen einfachen Screeningtest zu verfügen, der die Konstanz und gleichmäßige Verteilung von mit Plasma exponierten Oberflächen erfasst. Hierfür liegt es nahe, Mikroorganismen, die als Suspension gleichmäßig auf Agarplatten verteilt wurden, als biologische Testsysteme einzusetzen. Zur Testung der Antibiofilmmaktivität lässt man Mikroorganismen an Oberflächen adhären, damit sie dort unter geeigneten Bedingungen einen Biofilm entwickeln. Nach der Plasmaeinwirkung auf den Biofilm werden die Mikro-

organismen von der Oberfläche entfernt und für die weitere Untersuchung in Suspension gebracht [8]. Die Konstanz und Gleichmäßigkeit der Plasmaeinwirkung kann hierbei allerdings nicht direkt erkannt werden. Ebenso verhält es sich bei der Einwirkung auf inhomogene Oberflächen wie z.B. Wundgewebe, bei denen unregelmäßig ausgeprägte Effekte auf die Struktur der Oberfläche zurückgeführt werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des Mikroorganismen-Agar-Tests (MAT) als Screening-Methode zur Prüfung der homogenen Wirksamkeit für Plasmaquellen mit flächigem Plasmafeld anhand von zwei Barriere-Entladungs-Quellen überprüft.

Methode

Erregersuspension

Für die Versuche wurden die biofilmbildenden Stämme *Pseudomonas aeruginosa* SG81 und *Staphylococcus epidermidis* RP 62A eingesetzt. *Pseudomonas aeruginosa* SG81 (*P. aeruginosa*) wurde aus einem technischen Wassersystem isoliert und ist gut charakterisiert [9]. *Staphylococcus epidermidis* RP 62A (*S. epidermidis*) wird von vielen Arbeitsgruppen als biofilmbildender Referenzstamm verwendet [10], [11], [12], [13].

Zur Herstellung der ersten Subkultur wurde eine Glasperle mit dem Erreger unter aseptischen Bedingungen aus einem Kryo-Röhrchen entnommen und auf einer Blutagar-Platte (Columbia Agar + 5% Schafsblut, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) ausgerollt. Die Platte wurde 24 h bei 37 °C bebrütet. Davon wurden Subkulturen auf Blutagar erstellt und für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach anschließendem Abschwemmen und 3-maligem Waschen mit gepufferter Kochsalzlösung (PBS) mittels Zentrifugation bei 2500 U/min für 15 min wurde der Überstand dekantiert und in je 10 ml PBS resuspendiert. Mittels Verdünnungsreihe wurde die Endkonzentration der Erreger auf 10^4 Koloniebildende Einheiten (KbE)/ml eingestellt.

Versuchsaufbau

Es wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 55 mm (TPP, Trasadingen, Schweiz), und 96 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit CASO-Agar (Roth, Karlsruhe, Germany) vorbereitet. Abschließend wurden die gewaschenen Bakteriensuspensionen mit einem sterilen Wattetupfer mit einer Endkonzentration von 10^5 KbE/ml auf der Agaroberfläche ausgestrichen. Um gleichmäßig trockene Platten für die Testung des Plasmas zu erhalten, wurde eine Trocknungszeit von 30 min eingehalten. Direkt im Anschluss erfolgte die Plasmaapplikation. Anschließend wurden die Platten für 24 h (*P. aeruginosa*) bzw. 48 h (*S. epidermidis*) bei 37 °C bebrütet.

Plasmabehandlung

Es wurden zwei verschiedene SBD geprüft. Plasmaquelle A ist durch folgende Parameter charakterisiert: $U_{ss} = 4$ kV, 30 kHz, gepulst mit 250 ms An-Zeit, 750 ms Aus-Zeit, Gasfluss 5 Standardliter/min (slm) bei Argon. Plasmaquelle B hat folgende Parameter: $U_{ss} = 3$ kV, 40 kHz, gepulst mit 250 ms An-Zeit, 750 ms Aus-Zeit, Gasfluss 0,5 slm bei Argon (beide Quellen sind vom Leibniz Institute für Plasmaforschung und Technologie e.V. Greifswald entwickelt worden).

Die Platten wurden 30 s, 60 s und 120 s mit Plasmaquelle A und 60 s bis 6 min mit Plasmaquelle B behandelt. Der Abstand zwischen den Elektroden und der Agaroberfläche betrug 2 mm. Um bei der Behandlung mit Argon-Plasma Einflüsse von der Umgebung zu verhindern, wurde der zu behandelnde Bereich abgeschirmt und der Raum zwischen der Elektrode und der Agarfläche 1 min lang mit Argon „gespült“.

Ergebnisse

Bei mit Argon-Plasma behandelten Agarplatten (Gasfluss 5 slm) der Plasmaquelle A erfolgte die Plasmaeinwirkung im Zentrum auf einer Fläche von ca. 12 cm^2 (Abbildung 1 und Abbildung 2). Es trat eine deutliche Wachstumshemmung mit fortschreitender Behandlungsdauer auf. Im Zentrum der behandelten Fläche blieb die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien von *P. aeruginosa* (Abbildung 1) und *S. epidermidis* (Abbildung 2) bestehen.

Mit Luft-Plasma behandelte Agarplatten (ohne Gasfluss) der Plasmaquelle A sind in Abbildung 3 und Abbildung 4 gezeigt. Hierbei ist eine deutliche Inaktivierung von *P. aeruginosa* (Abbildung 3) und *S. epidermidis* (Abbildung 4) bereits nach 30 s Plasmabehandlung vorhanden. Nach 30 s Behandlungszeit blieben v.a. im rechten oberen Bereich noch wachstumsfähige Erreger sichtbar. Der Rand auf der rechten Seite war deutlich ungleichmäßiger abgeschlossen.

In Abbildung 5 sind mit Argon-Plasma (Gasfluss 0,5 slm) behandelte Agarplatten mit *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* der Plasmaquelle B gezeigt. Im Zentrum erfolgte auf einer runden Fläche von ca. 10 cm^2 die Plasmaeinwirkung. Beide Platten der Abbildung 5 waren vollständig bewachsen.

Mit Luft-Plasma (ohne Gasfluss) der Plasmaquelle B behandelte Agarplatten mit *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* sind nach identischer Plasmabehandlung in Abbildung 6 und Abbildung 7 gezeigt. Auf der linken Seite war ein deutlicherer Bewuchs erkennbar, während rechts nach gleicher Behandlungszeit nur vereinzelte Kolonien übrig blieben.

Diskussion

Die Behandlung von auf Agarnährboden ausgestrichenen Bakterien ist ein einfacher Test. Er wird oft zum Nachweis

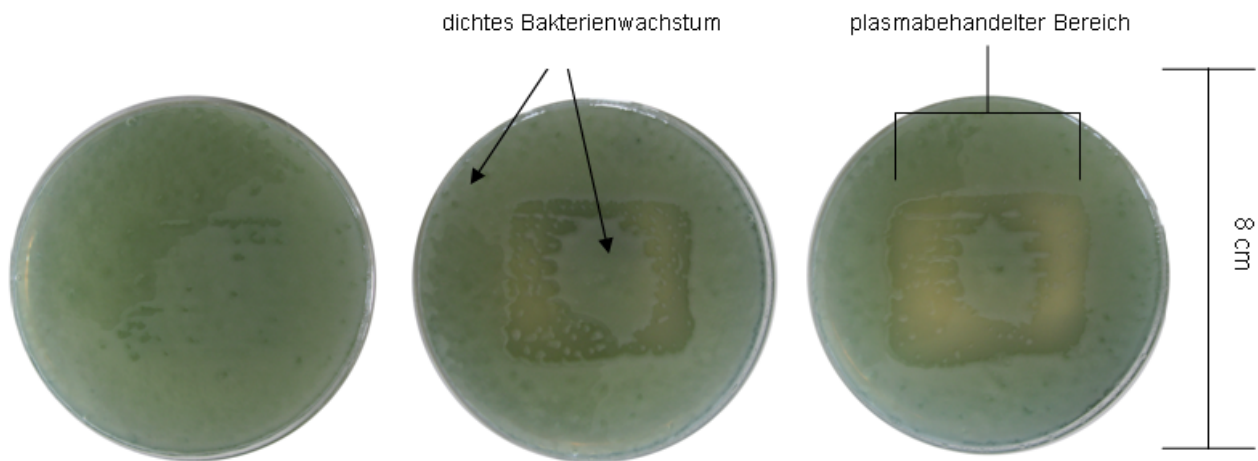


Abbildung 1: Plasmaquelle A, Argon-Plasma, Behandlungszeit von links nach rechts 30 s, 60 s und 120 s mit *Pseudomonas aeruginosa* SG81

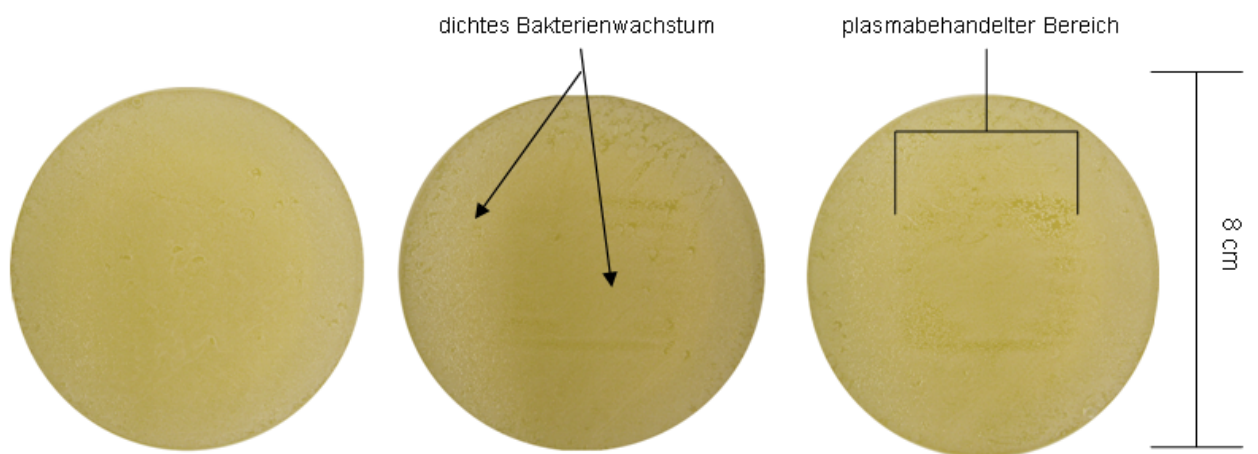


Abbildung 2: Plasmaquelle A, Argon-Plasma, Behandlungszeit von links nach rechts 30 s, 60 s und 120 s mit *Staphylococcus epidermidis* RP62A

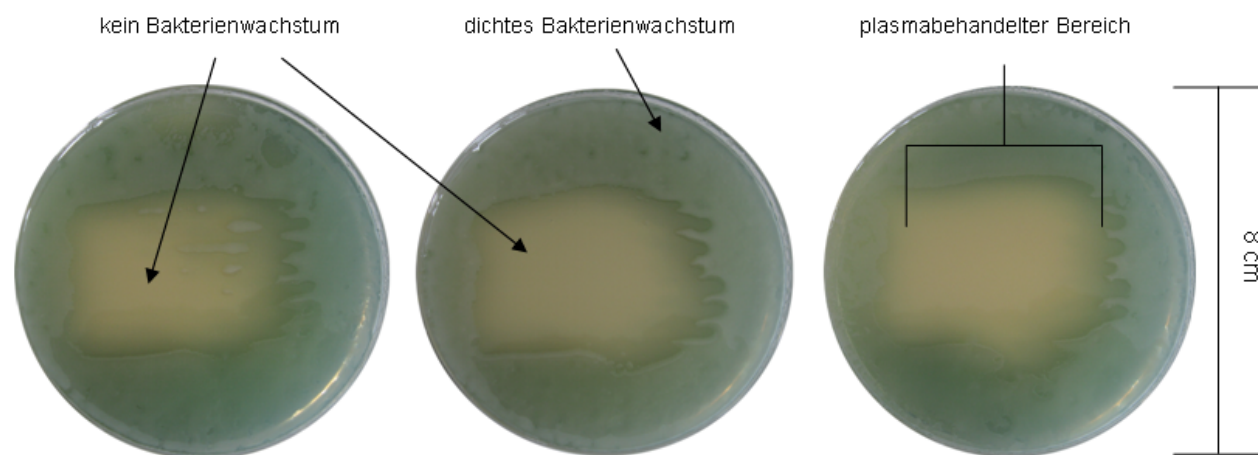


Abbildung 3: Plasmaquelle A, Luft-Plasma, Behandlungszeit von links nach rechts 30 s, 60 s und 120 s mit *Pseudomonas aeruginosa* SG81

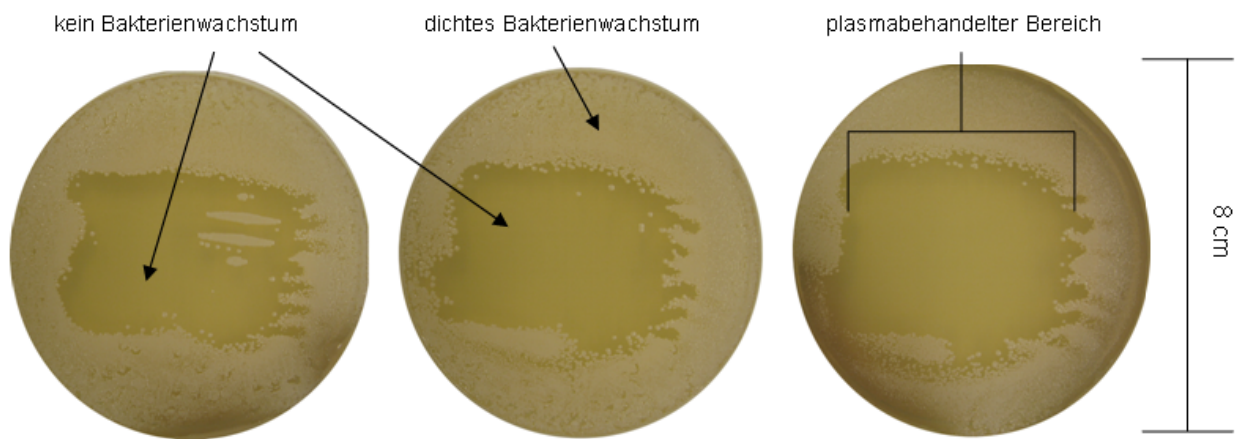


Abbildung 4: Plasmaquelle A, Luft-Plasma, Behandlungszeit von links nach rechts 30 s, 60 s und 120 s mit *Staphylococcus epidermidis* RP62A



Abbildung 5: Plasmaquelle B, Argon-Plasma, Behandlungszeit 6 min mit *Pseudomonas aeruginosa* SG81 (links, dichtes Bakterienwachstum) und *Staphylococcus epidermidis* RP62A (rechts, dichtes Bakterienwachstum)

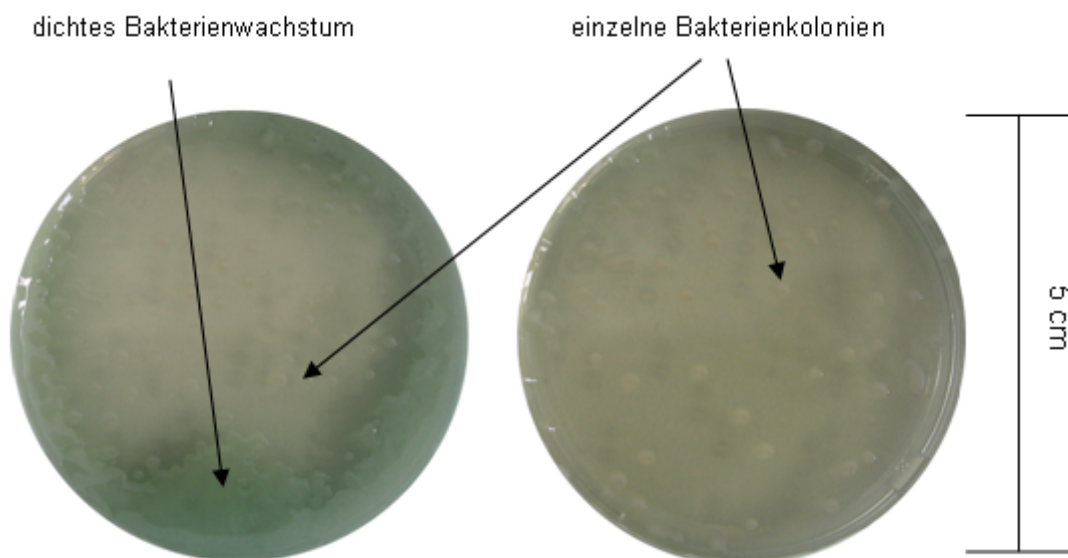


Abbildung 6: Plasmaquelle B, Luft-Plasma, Behandlungszeit 1 min mit *Pseudomonas aeruginosa* SG81

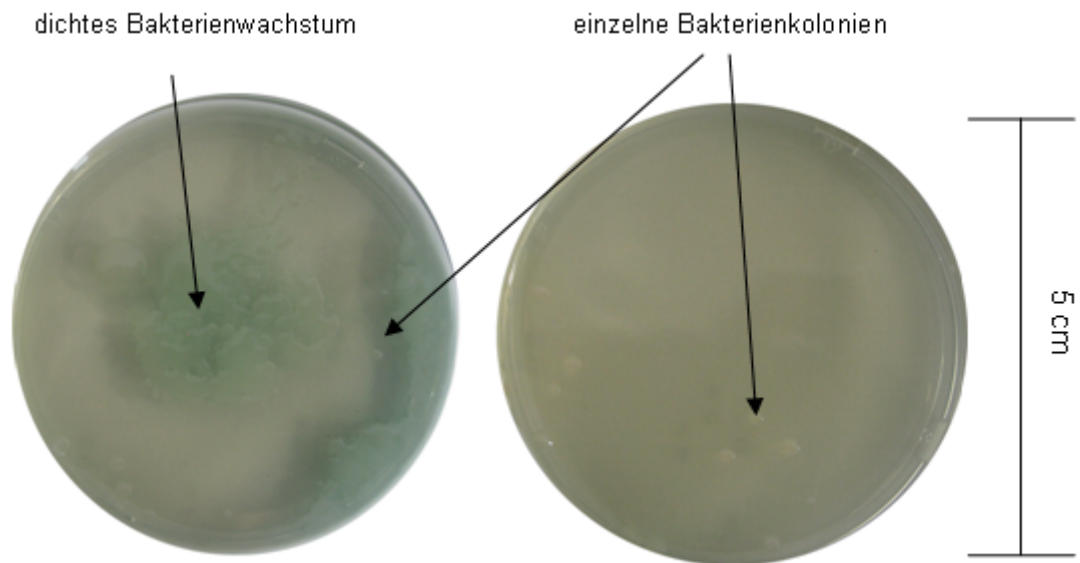


Abbildung 7: Plasmaquelle B, Luft-Plasma, Behandlungszeit 2 min mit *Pseudomonas aeruginosa* SG81

der antimikrobiellen Wirksamkeit von Plasmaquellen verwendet, z. B. bei Pompl et al. [14], Laroussi et al. [15], Shimizu et al. [16] und Morfill et al. [17]. Der MAT ist aber zugleich geeignet, um Aussagen über die Stabilität und Homogenität der biologischen Plasmawirkung zu treffen. In Abbildung 1 und Abbildung 2 sind das Wachstum bzw. die Inaktivierung von *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* nach zeitabhängiger Argon-Plasmabehandlung der Plasmaquelle A gezeigt. Innerhalb des behandelten Bereichs ist eine Inaktivierungszone erkennbar, die mit verlängerter Behandlungszeit deutlicher wird. Jedoch bleibt unabhängig von der Einwirkungszeit im Zentrum eine vitale Zone mit bakteriellem Wachstum erhalten. Im Gegensatz hierzu ist dieses Phänomen in Abbildung 3 und Abbildung 4 nach der Behandlung mit der gleichen Plasmaquelle nicht vorhanden. Hier bleibt nur der rechte Rand des behandelten Bereichs fransig. Der Unterschied beider Behandlungen liegt im Trägergas Argon bzw. Luft für das Plasma. Bei der Argon-Plasmabehandlung wurde ein möglicher Einfluss der Umgebungsluft verhindert, so dass sich daraus schließen lässt, dass die Verteilung des „after glow“ unter der Fläche (Abbildung 1 und Abbildung 2) nicht gleichmäßig stattfand. Zusätzlich ist im Vergleich der Erreger eine geringere Sensitivität gegen Argon-Plasma von *S. epidermidis* mit stärkerem Wachstum gegenüber *P. aeruginosa* feststellbar. Abbildung 5 zeigt *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* nach Plasmabehandlung mit einer Dauer von 6 min mit Quelle B. Es fand keine Inaktivierung der Erreger statt, der Agar wurde vollständig bewachsen. Die Ergebnisse der Plasmaquelle A, die einen antimikrobiellen Effekt bereits nach 30 s Argon-Plasma zeigt, machen deutlich, dass die biologische Wirkung einer Plasma-Art (hier SBD) stark von der Bauweise und dem Leistungseintrag/ Behandlungsfläche der Quelle abhängt. Möglicherweise gibt es einen Schwellenwert, im Leistungseintrag, ab dem Argon-Plasma erst einen antimikrobiellen Effekt aufweist. Interessanterweise macht sich der Unter-

schied bei Luft-Plasma so nicht bemerkbar (Abbildung 3 und Abbildung 4).

Bei Abbildung 6 und Abbildung 7 sind deutliche Effekte bei *P. aeruginosa* erkennbar. Die bakterielle Inaktivierung gleich behandelte Platten, bei Abbildung 6 und Abbildung 7, unterscheidet sich jedoch deutlich. Die Plasmaquelle B ist mehrmals baugleich vorhanden, so dass die Behandlung parallel verlaufen konnte. Die Ergebnisse mit *S. epidermidis*, nach den Behandlungen mit Luft-Plasma, wurden nicht dargestellt, da kein Wachstum nach 1 min mehr erfolgte. Es ist denkbar, dass *S. epidermidis* empfindlicher als *P. aeruginosa* auf Luft-Plasma reagiert.

Die Untersuchung ergab, dass bereits geringe Unterschiede im Aufbau der Plasmaapplikation und vermutlich auch zwischen Geräten gleicher Bauweise eine veränderte Wirkung auf biologische Systeme zur Folge haben können. Auf Grund der möglichen Abweichungen in der antibakteriellen Wirksamkeit von gleichen Fabrikaten wird in unserem Labor ein derartiges Screening zukünftig routinemäßig vor der Erprobung spezieller medizinischer Applikationen durchgeführt.

Ein solches Screening ist bei allen Plasmaanwendungen hilfreich, die über eine Veranschaulichung der antibakteriellen Effektivität einer Quelle hinausgehen. Plasmabehandlungen von Lösungen, Biofilmen und Zellkulturen oder Oberflächenbehandlungen sind Beispiele hierfür. Häufig wird eine optische Begutachtung der Lichtentwicklung des erzeugten Plasmas als ausreichend angesehen. Jedoch können nicht nur externe Einflussfaktoren (z.B. Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit, Sauerstoffgehalt) Schwankungen der Plasmawirkung hervorrufen, sondern auch technisch verborgene Faktoren (z.B. die Verteilung des „after-glow“).

Für den verlässlichen Einsatz des MATs wird vorausgesetzt, dass die Agarplatte gleichmäßig mit dem Erreger bestrichen wird, damit es zu keinen erheblichen Schwankungen der Erregerdichte auf der zu behandelnden Fläche kommt. Die Oberfläche des Agars muss eben

und horizontal sein, um einen gleichmäßigen Abstand zur Elektrode zu gewährleisten.

Konklusion

Um Fehlinterpretationen von Versuchsergebnissen zu vermeiden, werden Vortests zur Überprüfung der Plasmaquelle empfohlen, besonders wenn diese sich noch im Entwicklungsstadium befindet. Der MAT ist ein hilfreiches Werkzeug, um die Qualität der Wirkung einer flächigen Plasmaquelle kenntlich zu machen. Er lässt sich als Screeningmethode mit Bewertung nach frühestens 24 h zur Beurteilung der Konstanz und Homogenität der antimikrobiellen Plasmawirkung neuer Plasmaquellen nutzen.

Danksagung

Die Arbeit wurde innerhalb des 2008 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) bewilligten interdisziplinären Projekts „CampusPlasmaMed“ innerhalb des Leitprojekts „PlasmaBiozid“ erstellt. Die Autoren danken dem BMBF für die Förderung (BMBF, Förderkennzeichen 13N9779).

Literatur

- Höller C, Martiny H, Christiansen B, Rüdén H, Gundermann KO. The efficacy of low temperature plasma (LTP) sterilization, a new sterilization technique. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1993;194(4):380-91.
- Chau TT, Kao KC, Blank G, Madrid F. Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. *Biomaterials.* 1996;17(13):1273-7. DOI: 10.1016/S0142-9612(96)80003-2
- Kramer A, Lindequist U, Weltmann KD, Wilke C, von Woedtke T. Plasma Medicine – its perspective for wound therapy. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2008;3(1):Doc16. Available from: <http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2008-3/dgkh000114.shtml>
- Weltmann KD, von Woedtke T, Brandenburg R, Ehlbeck J. Biomedical applications of atmospheric pressure plasma. II Central European Symposium on Plasma Chemistry 2008. *Chem Listy.* 2008;102:s1450-s1451. Available from: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_16_s1450-s1451.pdf
- Lloyd G, Friedman G, Jafri S, Schultz G, Fridman A, Harding K. Gas Plasma: Medical Uses and Developments in Wound Care. *Plasma Process Polym.* 2010;7:194-211. DOI: 10.1002/ppap.200900097
- Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, van Dijk J, Zimmermann JL. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phys.* 2009;11:115012. DOI: 10.1088/1367-2630/11/11/115012
- Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure Appl Chem.* 2010;82(6):1223-37. DOI: 10.1351/PAC-CON-09-10-35
- Koban I, et al. Killing and removal of dental biofilms from titanium implant surfaces. In: *BMT 2010. (BMT 2010 Reguliäre Beiträge).* Rostock-Warnemünde, Germany; 2010.
- Grobe S, Wingender J, Trüper HG. Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J Appl Bacteriol.* 1995;79(1):94-102.
- Christensen GD, Barker LP, Mawhinney TP, Baddour LM, Simpson WA. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 1990;58(9):2906-11.
- Anglen J, Apostoles PS, Christensen G, Gainor B, Lane J. Removal of surface bacteria by irrigation. *J Orthop Res.* 1996;14(2):251-4. DOI: 10.1002/jor.1100140213
- Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun.* 2005;73(5):3007-17. DOI: 10.1128/IAI.73.5.3007-3017.2005
- König DP, Perdreau-Remington F, Rütt J, Stossberger P, Hilgers RD, Plum G. Slime production of *Staphylococcus epidermidis*: increased bacterial adherence and accumulation onto pure titanium. *Acta Orthop Scand.* 1998;69(5):523-6. DOI: 10.3109/17453679808997791
- Pompl R, et al. The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging. *New J Phys.* 2009;11:115023. DOI: 10.1088/1367-2630/11/11/115023
- Laroussi M, Tendero C, Lu X, Alla S, Hynes WL. Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil. *Plasma Process Polym.* 2006;3(6-7):470-3. DOI: 10.1002/ppap.200600005
- Shimizu T, Steffes B, Pompl R, Jamitzky F, Bunk W, Ramrath K, et al. Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination. *Plasma Process Polym.* 2008;5(6):577-82. DOI: 10.1002/ppap.200800021
- Morfill GE, Shimizu T, Steffes B, Schmidt HU. Nosocomial infections-a new approach towards preventive medicine using plasmas. *New J Phys.* 2009;11:115019. DOI: 10.1088/1367-2630/11/11/115019

Korrespondenzadresse:

Dipl. Hum. biol. Rutger Matthes
Institut für Hygiene und Umweltmedizin,
Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Walther-Rathenau-Straße
49a, 17487 Greifswald, Deutschland
rutger.matthes@uni-greifswald.de

Bitte zitieren als

Matthes R, Hübner NO, Bender C, Koban I, Weltmann KD, Kramer A. Screening test for quality control of surface barrier discharged plasma sources with the microorganism-agar test (MAT). *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2010;5(2):Doc02. DOI: 10.3205/dgkh000145, URN: urn:nbn:de:0183-dgkh0001458

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2010-5/dgkh000145.shtml>

Veröffentlicht: 21.09.2010

Copyright

©2010 Matthes et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.