



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Bioprodukttechnologie

Fachgebiet Mikrobiologie

WS 2011/2012

Abschätzung genotoxischer Effekte durch Kalt-Plasma mit Hilfe des
„Reverse *Salmonella* Mutagenicity Assay“ (Ames Test)

Bachelorarbeit

Vorgelegt von: Christin Hackethal

Betreuer: Prof. Dr. Karl Steffens
Prof. Dr.-Ing. Heralt Schöne

Datum: 16.02.2012

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2013 - 0125 - 0

Abstract

Sterilization and decontamination techniques for surfaces are important in many technologically based processes in industry, medicine and research. Beside other methods plasma is used for this purpose. Hence possible risks must be investigated of such a technique. In the present work the mutagenic potential of an indirect plasma treatment on bacteria test strains should be estimated by using the Ames Test. The Plasma was generated by a surface dielectric barrier discharge (DBD) plasma source. As test strains the histidine mutants of *Salmonella typhimurium*, TA 98 and TA100 were used. The TA98 and TA100 strains were exposed to the plasma for different defined durations in a buffered fluid. Appropriate to the number of ascertained revertants after the plasma treatment, no significant genotoxic effect could be proved within this study, although there were some indications. In consideration of the fact that only a minor range of parameters could be investigated further experiments are necessary.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Wissenschaftliche Grundlagen	7
2.1	Kalt-Plasma	7
2.1.1	Wirkungen von Kalt-Plasma auf biologische Systeme	8
2.2	Beschreibung der verwendeten Salmonellen-Stämme	11
2.2.1	His-Mutation	12
2.2.2	Rfa Mutation	13
2.2.3	uvrB Mutation	13
2.2.4	Plasmid pKM 101 – Ampicillin Resistenz	14
2.3	Ames Test	15
2.3.1	Spontane Rückmutation	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.2	Aufbau und Gebrauch der Plasmazelle	19
3.3	Anzucht und Vorbereitung der Teststämme	23
3.4	Bestimmung der Gesamtkeimzahl	23
3.5	Behandlung der Teststämme mit indirekt appliziertem Kaltplasma	24
3.6	Abschätzung genotoxischer Effekte mittels Ames Test	25
4	Ergebnisse und Diskussion	26
5	Zusammenfassung	32
	Verzeichnisse	33
	Abkürzungsverzeichnis	33
	Abbildungsverzeichnis	33
	Tabellenverzeichnis	34
	Literaturverzeichnis	35
	Anhang	37
	A Rezepturen	37
	B Ergebnisse	41
	Eigenständigkeitserklärung	45

1 Einleitung

Sterilisation und Dekontamination von Oberflächen ist in vielen technologischen Anwendungsbereichen, z. B. der Lebensmittelindustrie, der Herstellung von Verpackungen, aber auch der Erhaltung von alten Schriften und Manuskripten integriert. Die Nachfrage nach kompletter Deaktivierung, Zerstörung oder Entfernung von lebenden Mikroorganismen, sowie verschiedener Arten von pathogenen Biomolekülen von Oberflächen ist außerdem in der Medizin von höchster Wichtigkeit, um die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten. Studien belegen jedoch das Vorhandensein von biologischen Kontaminationen nach der Reinigungs-Sterilisation-Dekontaminations-Kette. Dabei handelt es sich hauptsächlich um biologische Pathogene, die eine Resistenz gegen chemische oder physikalische Behandlungen aufzeigen. Folglich sind extreme Prozessbedingungen nötig, um solche biologischen Systeme zu eliminieren.

Vielversprechende Techniken zur Behandlung von festen Oberflächen sind u. a. der Einsatz von Plasma-Entladungen und Kalt-Plasmen bzw. Niederdruck-Plasmen. Die Anwendung von Plasma-basierten Technologien kann bei Raum- oder mäßigen Temperaturen durchgeführt werden, was den Prozess für die Verarbeitung einer Vielzahl an Kunststoffen ermöglicht. Eine besondere Bedeutung stellt dies für die Herstellung von medizinischen Gegenständen dar. Weiterhin können für die Erzeugung des Plasmas nicht-giftige Gase verwendet werden, womit die Sicherheits- und Umweltrisiken im Vergleich zu üblichen Substanzen, die für chemische Behandlungen genutzt werden, minimal sind.

Laut RAUSCHER et al. (2009) dienen Plasmabehandlungen als ein universelles Mittel für die Eliminierung oder Deaktivierung für viele verschiedene biologische Pathogene. Es wurde bereits mehrfach demonstriert, dass Plasmen unter entsprechenden operativen Bedingungen zu einer schnellen Sterilisation von verschiedenen Bakterienstämmen oder zur effizienten Eliminierung von restlichen Proteinen auf der Oberfläche genutzt werden können. Aufgrund der Komplexität von Plasmen besteht jedoch ein „Wissensloch“ über den zugrundeliegenden Prozess.

Für ein Plasma als effiziente Quelle von energetischen Photonen, geladenen Teilchen und verschiedenen Radikalen in ihren Grund- oder Anregungszuständen können mehrere Ursachen für die Modifizierung von biologischen Systemen ausgemacht werden, die durch ihre Wirkungsweisen einen potentiellen Beitrag zur Inaktivierung oder Eliminierung der biologischen Systeme liefern (Rauscher 2009).

Bei der Sterilisation von Materialien und Geräten wirkt Plasma auf die Mikroorganismen unter mehr oder weniger feindlichen Lebensbedingungen - normalerweise im trockenen Zustand - ein. In nassen Umgebungen oder in wässrigen Lösungen ergibt sich eine unübersichtlichere Situation. Die Lebens- und Wachstumsbedingungen für die Mikroorganismen sind besser und komplexer. Hinsichtlich der Plasmabehandlung stellt die flüssige Umgebung dagegen eine zusätzliche Barriere dar, die die direkte Interaktion zwischen Bakterien und Plasma erschwert. Der durch das Plasma induzierte Effekt muss folglich durch die flüssige Phase vermittelt bzw. übertragen werden. Die UV-Strahlen und „reaktiven Spezies“, die durch Plasmen erzeugt werden, müssen erst in die Flüssigkeit eindringen bzw. eindiffundieren um mit den mikrobiologischen Zellen bzw. Systemen zu interagieren. Eine Plasma-induzierte Veränderung der flüssigen Umgebung führt demzufolge zu den biologisch wirksamen Plasmaeffekten (Oehmigen 2010). Die Wechselwirkungen zwischen Plasma und Flüssigkeiten wurden bereits von einigen Autoren beschrieben. Beispielsweise veröffentlichten BRUGGEMAN und LEYS (2009) einen Bericht über die Entstehungsmechanismen sowie physikalischen Eigenschaften von erzeugten Plasmen in Kontakt mit Flüssigkeiten. Dabei wurden außerdem die praktische Anwendung für die Wasseraufbereitung, einschließlich des Abbaus organischer Schadstoffe, sowie der Inaktivierung von Mikroorganismen diskutiert (Oehmigen 2010).

In Zusammenarbeit mit dem Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. in Greifswald erforscht die Hochschule Neubrandenburg Auswirkungen von indirekt appliziertem Plasma auf verschiedene biologische Systeme.

Es handelt sich dabei um einen Unterauftrag des Bundesministeriums für Bildung und Forschung, welcher innerhalb des Projektes „PlasmaVitro“ bearbeitet wird. Unter diesem Aspekt soll in der vorliegenden Bachelorarbeit eine „Abschätzung genotoxischer Effekte durch Kalt-Plasma mit Hilfe des Reverse *Salmonella* Mutagenicity Assay (Ames Test)“ vorgenommen werden.

Ziel ist es mittels des *Salmonellen* Tests das mutagene Potential von indirekt appliziertem Kaltplasma zu untersuchen. Dafür wurden im Labor Experimente mit den Teststämmen *Salmonella* TA98 und *Salmonella* TA100 unter Bestimmung der Rückmutationen durchgeführt.

„Das Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. in Greifswald ist europaweit die größte außeruniversitäre Forschungseinrichtung, die sich mit den Grundlagen und Anwendungen von Niedertemperaturplasma beschäftigt“ (www.inp-geifswald.de 2012).

2 Wissenschaftliche Grundlagen

Die Anzahl der Publikationen über Salmonellen Tests ist seit der Veröffentlichung des Original Methoden Papers von MARON und AMES aus dem Jahr 1982 enorm angestiegen (Ames 1982).

Der Ames Test wird nicht nur für die Untersuchung von Chemikalien, sondern ebenfalls für die Bestimmung der Mutagenität von komplexen Umwelt- und biologischen Proben genutzt. Studien ergaben, dass eine beträchtliche Zahl an Mutagenen, die zunächst mit dem Salmonellen Test positiv geprüft wurden, anschließend eine kanzerogene Wirkung in Tierversuchen zeigten. Mutagene Substanzen sind Stoffe, die Mutationen, d. h. im Allgemeinen Veränderungen der genetischen Informationen auf der DNA auslösen (Ames 1982, Brodhäcker 2011).

Bei Plasma handelt es sich im Gegensatz zur gewöhnlichen Anwendung des Ames Tests nicht um eine zu untersuchende Chemikalie oder biologische Matrix, sondern um einen Zustand überhitzter Materie bzw. Gase. Heutzutage lassen sich Plasmen mit Hilfe verschiedener Anregungsarten in unterschiedlichen Druckbereichen mit differierenden Gastemperaturen, Teilchenenergien und -dichten erzeugen. Das Angebot reicht dabei von angeregten Glimmentladungen, Barriereentladungen, Plasmastrahlenquellen, bis hin zu einer gepulsten Plasmaerzeugung, wodurch ein breiter Einsatzbereich ermöglicht wird (www.techportal.de 2012).

2.1 Kalt-Plasma

Das Wort Plasma stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Gebilde“. Im physikalischen Sinne wurde der Begriff von I. LANGMUIR (1930) geprägt und ist eine Bezeichnung für überhitzte Gase, deren Eigenschaften durch die Aufspaltung der Moleküle in Ionen und Elektronen bestimmt sind (Thieme RÖMPP Online 2012). Plasma wird neben festen, flüssigen und gasförmigen Phasen oft als vierter Aggregatzustand bezeichnet. Heizt man feste Materie auf, wird sie zunächst flüssig, dann gasförmig. Führt man diesem Gas weitere Energie zu, wird es elektrisch leitend.

Nach Außen bleibt es dabei mehr oder weniger neutral, da sich die Elektronen von den Atomen bzw. Molekülen des Gases lösen (BMBF 2000).

Die für das Ablösen der einzelnen Elektronen benötigte Energie nennt man Ionisierungsenergie. Hinsichtlich einzelner Eigenschaften ist der Plasma-Zustand mit dem gasförmigen Zustand vergleichbar, z. B. keine feste Form und geringe Verschiebungskräfte. Plasmen enthalten neben positiv geladenen Ionen und negativ geladenen Elektronen auch Radikale und angeregte sowie nicht-angeregte Neutralteilchen. Unter anderem ist Plasma in der Sonne, heißen Sternen und bei thermonuklearen Reaktionen (Kernfusion) vorzufinden. „Rund 99 % der sichtbaren Materie im Weltall liegt in Form von Plasma vor“ (Thieme RÖMPP Online 2012).

Neben dem „heißen“ Plasma, kann auch nicht-thermisches bzw. Nieder-temperatur Plasma („Kaltes Plasma“) in Gasentladungen existieren. Diese Form des Plasmas befindet sich im Gegensatz zum thermischen Plasma nicht im thermischen Gleichgewicht, d. h. die verschiedenen Teilchen innerhalb des Plasmas besitzen unterschiedliche Temperaturen bzw. Energien. Durch elektromagnetische Felder werden nur die Elektronen beschleunigt und aufgeheizt. Ionen und Atome bleiben kalt, so dass das Plasma lediglich eine Gastemperatur von 40 – 50 °C besitzt. Die Energie der Elektronen in solchen Plasmen entspricht einer Temperatur von einigen 10.000 °C (BMBF 2000).

Dieses Phänomen liegt bspw. bei Nordlichtern, Flammgasen und Lichtbögen vor (Thieme RÖMPP Online 2012).

2.1.1 Wirkungen von Kalt-Plasma auf biologische Systeme

Bei der Plasmabehandlung von Oberflächen, Materialien oder Geräten ist die Vielfalt biologischer Systeme zu beachten. Die Betrachtung verschiedener Herangehensweisen ist notwendig, um einen Erfolg zu garantieren. Eine allgemeine Einteilung der biologischen Pathogene in zwei Gruppen ermöglicht die Festlegung unterschiedliche Prüfkriterien für die Prozessentwicklung.

Die erste Gruppe bilden die lebenden Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Sporen oder Schimmel. Diese sollen getötet oder ihre Fähigkeit zur Fortpflanzung gestoppt werden (Sterilisation). Die zweite Gruppe stellen Biomoleküle, z.B. Prionen und bakterielle Endotoxine dar. Es wird eine Eliminierung oder das Abschalten der biologischen Aktivität angestrebt (Dekontamination) (Wallhäußer 1995, Rauscher 2009).

Es existieren bereits einige Studien über den Effekt von Plasma-Entladungen auf bakterielle Sporen. „Diese miteinander zu vergleichen ist jedoch schwierig, da unterschiedliche Bakterienstämme, sowie Plasmasysteme genutzt wurden“ (Rauscher 2009). In einigen Experimenten gab man die zu behandelnden Objekte direkt in die aktive Plasma-Entladung, in anderen in das Plasmanachglühen. Die verschiedenen Prozessparameter führten zu unterschiedlichen Aufschlüsselungen der Teilchen und Strahlungen, die somit einen einfachen Vergleich der Ergebnisse erschweren. Dennoch können die Hauptbefunde zusammengefasst werden. Die primäre sporentötende Wirkung von Niederdruck-Plasma-Entladungen geht von UV-Strahlen aus, diese durchdringen die Sporenzellwand und verursachen irreversible Veränderungen. Die DNA-Stränge werden gespalten und das genetische Material verändert. Die Aussage basiert auf der Korrelation zwischen der Plasmalichtintensität und der Reduktion von lebenden Sporen. Aufgrund dieser Entdeckung konnten in der Vergangenheit Plasmasterilisationsverfahren durch die experimentelle Maximierung der UV-Strahlenintensität optimiert werden (Rauscher 2009).

Detaillierte Studien über die Reduktion von koloniebildenden Einheiten von Sporen zeigen drei typische Phasen. In der ersten und schnellsten Phase besteht eine Korrelation der auf die DNA der Sporen wirkenden UV-Strahlen. Die zweite Phase ist langsamer und im Wesentlichen mit der Sporen-Erosion (Abtragung) verbunden. In diesem Schritt werden die oberen Schichten der Sporen abgetragen, um auch die unteren Schichten den UV-Strahlen auszusetzen. Die Abtragung könnte ebenfalls durch die Einwirkung der Strahlen erfolgen. Es erscheint jedoch plausibler, dass die äußeren Sporen durch chemisch aktive Spezies weggeätzt werden. Die dritte Phase ist wieder schneller. Sie korrespondiert mit der durch UV-Strahlung induzierten Inaktivierung der letzten Schicht Sporen auf der Oberfläche (Rauscher 2009).

Ein weiterer Effekt, der bei der Behandlung von Mikroorganismen mit Plasma beobachtet werden kann, ist das Absinken des pH-Wertes in flüssigen Medien. Indirekte Oberflächenbehandlungen zeigten eine schrittweise Abnahme des pH-Wertes in flüssigen, nicht-gepufferten Medien. Im Gegensatz dazu bleibt der pH-Wert in gepufferten Medien annähernd stabil.

Untersuchungsergebnisse von OEHMIGEN et al. (2010) zeigen und belegen, dass durch die pH-Veränderung eine Keimabtötung mit Plasmabehandlung möglich ist. Es ist jedoch ungeklärt, welche Ursache zu der Abtötung führt. Das Absinken des pH-Wertes erschien zunächst der entsprechende Auslöser für die Inaktivierung zu sein. Versuche widerlegten diese These, da Mikroorganismen auch in sauren Umgebungen für eine gewisse Zeit überlebensfähig sind. Bei der Plasmabehandlung findet hingegen eine schnelle Dekontamination der biologischen Systeme statt. Weiterhin entstehen bei der Anwendung von Plasma reaktive Spezies, die als mögliche Ursache für die Ansäuerung der Medien, sowie die bakterienabtötende Wirkung in Frage kommen. Reaktive Spezies sind reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS – reactive oxygen species), sowie reaktive Stickstoff-Spezies (RNS – reactive nitrogen species). Es handelt sich dabei um hochreaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffmoleküle und Verbindungen mit unterschiedlicher Lebensdauer. Meist reagieren die Moleküle sofort oder die Verbindungen zerfallen. Beispiele für reaktive Spezies sind Ozon und Stickoxide. Durch die Anwesenheit von Wasser z. B. in der behandelten Flüssigkeit können sich zusätzlich Hydroxylradikale bilden. Als Folge der Korrelation zwischen dem Absinken des pH-Wertes und der Keimabtötung, sowie der Erkenntnis, dass ein niedriger pH-Wert alleine nicht zur Inaktivierung führt, wird ersichtlich, dass es sich um ein Zusammenspiel zwischen den sauren Bedingungen und den Wirkungen zusätzlicher Plasmaparameter handeln muss. Es gibt jedoch noch keine weiteren Bestätigungen dieser Annahme (Oehmigen 2010).

Durch das Einwirken von Plasma auf biologische Systeme ist im Allgemeinen eine Keimabtötung bzw. Inaktivierung von Biomolekülen möglich. Ungeklärt ist bisher, ob die einwirkende UV-Strahlung, die zur Veränderung des Erbgutes führt, geladene Partikel im Plasma, die die Außenhülle der Bakterien zum Platzen bringen oder das Absinken des pH-Wertes, sowie die Synergie mit reaktiven Spezies, die Ursache dafür ist.

Aufgrund der unterschiedlichen Studien bei denen verschiedene Plasmasysteme (direkte oder indirekte Behandlung) angewendet werden, kann hierzu kein allgemeingültiger Auslöser definiert werden. In Anbetracht der Komplexität von Plasmen ergibt sich die Annahme, dass es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren handelt (Oehmigen 2010).

2.2 Beschreibung der verwendeten Salmonellen-Stämme

Salmonellen ($d = 0,5$ bis $1,5 \mu\text{m}$; $l = 2$ bis $4 \mu\text{m}$) sind gram-negative Bakterien, der Familie der Enterobacteriaceae. Sie sind peritrich begeißelt, fakultativ anaerob und können Laktose nicht verwerten. Die Unterscheidung von anderen laktosenegativen Enterobacteriaceae erfolgt durch biochemische und serologische Eigenschaften. Entsprechend des Kaufmann-Withe-Schemas werden aufgrund der spezifischen O - und H -Antigene etwa 2500 Serotypen beschrieben und klassifiziert. Salmonellen bilden keine Sporen (Krämer 2007, Berthold 2009).

Die Grundlage für den Ames Test bildet ein Satz an Histidin-auxotrophen *Salmonella Typhimurium* Stämmen mit unterschiedlichen Mutationen im Histidin Operon. Weitere Mutationen der Salmonellen erhöhen die Möglichkeit Mutagene zu untersuchen. Zu den gebräuchlichsten Teststämmen gehören *Salmonella* TA98 und *Salmonella* TA100, welche ebenfalls zu Verwendungszwecken für die vorliegende Bachelorarbeit verwendet wurden.

Salmonella TA98 und TA100 sind nicht in der Lage, Histidin selbständig zu synthetisieren. Sie weisen eine Resistenz gegen Ampicillin, sowie eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht und Kristallviolett auf (Ames 1982, Friedberg 2006, Steinbüchel 2003).

In der folgenden Abbildung (Abb. 1) werden *S. Typhimurium* dargestellt.

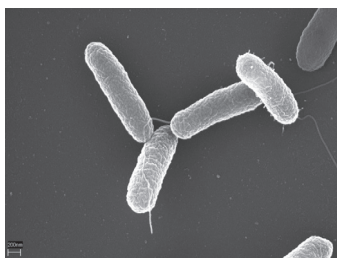


Abb. 1: *Salmonella Typhimurium* (Brinkmann, V., Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin)

2.2.1 His-Mutation

Die Histidin-Mutationen der verwendeten Teststämme unterscheiden sich im Genotyp bzw. der Spezifität der DNA-Sequenz.

Bei *Salmonella* TA100 wurde die Sequenz HisG 46 durch Basensubstitution verändert. Der Austausch einzelner Basen (hier Transition¹) führt dazu, dass anstelle der Aminosäure Leucin (-GAG-, -CTC) wie im Wildtyp die Aminosäure Prolin (-GGG-, -CCC-) synthetisiert wird (Missense-Mutation²). Die benötigte Aminosäure steht der Zelle nicht mehr zur Verfügung, dementsprechend verursacht die Mutation den Defekt des Enzyms Adenin-Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.7). Das Enzym greift bereits nach dem ersten Schritt der Histidin-Synthese ein, *Salmonella* TA100 ist demzufolge nicht in der Lage, die vollständige Histidin-Synthese auszuführen. Für das Wachstum ist dieser Stamm auf eine Histidin-Quelle in der Umgebung angewiesen. *Salmonella* TA100 detektieren vorzugsweise Mutagene, die Basensubstitution bewirken (Ames 1982, Steinbüchel 2003, Berthold 2009).

Bei *Salmonella* TA98 liegt eine Mutation im HisD 3052 Gen vor. Dieser Abschnitt codiert das Enzym Histidinol Dehydrogenase, welches für den letzten Syntheseschritt von Histidin benötigt wird. Durch die Verschiebung des Leserasters (Frame-Shift-Mutation) mittels Deletion (Löschen) wird der Code für Arginin von -CGG- auf -GGC- geändert, was eine Veränderung des genetischen Codes bis zum Leucin mit sich bringt. Durch die Verschiebung bildet sich statt des Triplets für Leucin (-CTG- im Wildtyp) ein Nonsense-Triplett (-TGA-), das zum Abbruch der Translation führt. „HisD Mutationen“ werden durch Mutagene wie 2-Nitrofluoren und Daunorubicin umgekehrt. *Salmonellen* TA98 detektiert vor allem Mutagene, die eine Frame-Shift-Mutation auslösen (Ames 1982, Steinbüchel 2003).

Der His-Charakter der Teststämme wird bestätigt durch die Demonstration der Histidin Nachfrage zum Wachsen mit Selektiv-Agarplatten (Ames 1982).

¹ Transition ist eine Basensubstitution, bei der einen Pyrimidinbase durch eine andere Pyrimidinbase oder eine Purinbase durch eine andere Purinbase ersetzt wird (Seyffert 2003).

² „Führt der Basenaustausch zum Austausch einer Aminosäure im Genprodukt, spricht man von Missense-Mutation“ (Seyffert 2003).

2.2.2 Rfa Mutation

Die rfa-Mutation verleiht den Teststämmen einen „Deep Rough Pänotypen“. Ursache dafür ist der partielle Verlust der Lipopolysaccharid Barriere (äußere Membran), die die Bakterien normalerweise beschichtet. Diese bietet gram-negativen Bakterien zusätzlichen Schutz gegen toxisch wirkende Stoffe mit großem Molekulargewicht z. B. Benzo(a)pyren. Durch die rfa-Mutation sind die Teststämme zugänglicher für mutagen wirkende Substanzen. Insbesondere wird der Zugang für die hydrophobe Testsubstanzen erleichtert (Ames 1982) (Steinbüchel 2003).

Teststämme die den „Deep Rough (rfa) Charakters“ haben, sollten auf die Empfindlichkeit von Kristallviolett getestet werden, um diese Mutation nachzuweisen. Dafür benötigt man Nährplatten mit den zu testenden Stämmen auf denen ein in Kristallviolett getränktes Filterpapier platziert wird (Ames 1982, Steinbüchel 2003, Friedberg 2006)

2.2.3 uvrB Mutation

Der uvrB Abschnitt der DNA codiert das Protein des „Excision Repair System“, das an der Reparatur von DNA Schäden durch UV-Licht, besonders Thymin-Dimerisierung, beteiligt ist. Bei der uvrB Mutation wurde dieses Gen entfernt, um eine Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht, sowie eine erhöhte Sensitivität für die Untersuchung von Mutagenen zu erreichen. Aus technischen Gründen erstreckt sich die Deletion des uvrB Gens durch das Biotin-Gen, d. h. die Biosynthese für Biotin wird verhindert. Als Konsequenz benötigen die Bakterien einen Zusatz von Biotin zum Wachsen. Biotin ist ein Co-Faktor der nur in sehr geringen Mengen von den Bakterien benötigt wird (Ames 1982, Steinbüchel 2003, Friedberg 2006).

Der Nachweis dieser Mutation erfolgt über einen UV-Nachweis, indem man Teststämme UV-Licht aussetzt.

2.2.4 Plasmid pKM 101 – Ampicillin Resistenz

„Plasmide sind extrachromosomale, zirkuläre oder lineare, fast immer doppelsträngige DNA-Moleküle, die in superspiralierter Form in der Zelle vorliegen“ (Fuchs 2007). Die Funktion von Plasmiden besteht in der Vermittlung von nützlichen Gensequenzen. Jedes Plasmid enthält mindestens eine Sequenz, den „Origin of Replication“ oder Replikationsursprung. Ist dieser kompatibel zum Bakterienstamm, kann das Plasmid unabhängig von der chromosomalen DNA repliziert werden, das Plasmid ist selbstreplizierend. Außerdem enthalten Plasmide häufig Antibiotika-Resistenzen, welche als Selektionsmarker dienen, da Bakterien normalerweise bei der Zugabe von Antibiotika abgetötet werden (Fuchs 2007).

Die Ampicillin³-Resistenz der Teststämme ist gleichermaßen ein Marker für die Anwesenheit des Plasmid pKM 101. Dieses Plasmid enthält Informationen für die Expression der „ γ -DNA-Polymerase“, welche besonders fehleranfällige DNA Replikationen katalysiert. Dadurch wird die Neigung zu chemischen und spontanen Mutationen der Teststämme erhöht.

Es ist hervorzuheben, dass die Ampicillin-Resistenz nichts mit der Erhöhung der Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Mutagenen zu tun hat. Es ist lediglich die Markierung bzw. der Nachweis für die Anwesenheit des Plasmids. Salmonellen, die dieses Plasmid nicht besitzen z. B. der Wildtyp, sind nicht in der Lage auf Nährböden mit Ampicillin zu wachsen (Ames 1982, Friedberg 2006, Steinbüchel 2003).

Die Teststämme sollten regelmäßig auf die Anwesenheit der Ampicillin-Resistenz getestet werden. Das Plasmid ist instabil, so dass das Bakterium die resultierende Eigenschaft verlieren kann (Ames 1982).

³ Ampicillin gehört zu den β -Lactam-Antibiotika, deren bakterizide Wirkung während der Zellteilung auftritt. Die Ausbildung einer neuen Zellwand wird blockiert (Berthold 2009).

2.3 Ames Test

B. AMES entwickelte Ende der 60er Jahre den „Reverse Salmonella Mutagenicity Assay“, kurz Ames Test. Dabei handelt es sich um eine Schnellanalyse zur Erkennung mutagenen Potentials verschiedener Substanzen. Durch die Abschätzung der Mutagenität eines Stoffes liefert der Test erste Hinweise auf Kanzerogenität.

Der Salmonella Test wurde zuerst in einer Studie mit 300 Chemikalien validiert, bei denen eine kanzerogene Wirkung zumeist bekannt war. Anschließend wurde der Test in Studien durch die „Imperial Chemical Industry“, „The National Cancer Center Research Institute In Tokyo“ und „The International Agency For Research On Cancer“ bestätigt. Fast 90 % der Kanzerogene, die in den Studien getestet wurden, wiesen eine Mutagenität auf. Umgekehrt zeigten 87 % der untersuchten Substanzen, die nicht kanzerogen waren, auch keine mutagene Wirkung. Die fehlenden 10 % der Korrelation zeigen, dass es in Einzelfällen notwendig ist, die Ergebnisse durch Tierversuche zu bestätigen (Ames 1982, Steinbüchel 2003, Friedberg 2006).

Das Testprinzip basiert auf der Verwendung von Mutantenstämmen, z. B. *Salmonella* TA 98 und *Salmonella* TA100 (Kap. 2.2). Durch die bestehende Histidin-Auxotrophie sind diese nicht in der Lage Histidin eigenständig herzustellen und benötigen somit für das Wachstum Histidin als Zusatz. In Gegenwart mutagener Stoffe kann es zu einer Rückmutation der Histidin-Biosynthesefähigkeit kommen. Diese kann an gleicher Stelle als direkte Rückmutation oder an anderer Stelle in Form einer Sekundärmutation erfolgen. Durch die Rückmutation sind die Stämme wieder fähig die Histidin-Biosynthese eigenständig durchzuführen. Um eine Steigerung der Empfindlichkeit zu erhalten, werden die Teststämme mit weiteren Modifikationen versehen (Kap. 2.2) (Steinbüchel 2003, Munk 2001).

Der Ames Test erlaubt durch die quantitative Auswertung auf Minimalmedium eine mengenmäßige Erfassung der mutagenen Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration des Mutagens. Der Mutationsindex stellt dabei das Verhältnis von der durch die Testsubstanz induzierten Rückmutation zu der spontanen Rückmutation als ein Maß für die Mutagenität der Substanz dar.

Somit ermöglicht der Test auch einen Vergleich zweier verschiedener Mutagene auf ihre unterschiedliche Wirkung (Steinbüchel 2003). Gleichzeitig bietet der Ames Test die Möglichkeit einer qualitativen Auswertung des mutagenen Potentials (Ames 1982) (Steinbüchel 2003).

In der Praxis wird das Testverfahren meist durch einen sog. S9 Mix erweitert, ein enzymatisch aktives Extrakt aus Leberzellen. Es soll die Simulation biochemischer Umwandlungen von Reagenzien in mutagene Wirkstoffe durch Enzyme der Leberzellen wiedergeben. Nicht alle mutagen wirkenden Fremdstoffen im menschlichen Körper wirken selbst mutagen oder kanzerogen. Einige werden erst durch den Stoffwechsel z. B. in der Leber zu Mutagenen umgewandelt. Durch die Modifizierung mit dem S9 Mix wird die Situation im menschlichen Körper wiedergespiegelt und damit die Aussagekraft des Tests hinsichtlich eines potentiellen Gesundheitsrisikos einer Substanz bekräftigt (Ames 1982, Steinbüchel 2003).

Anwendung findet der Ames Test u. a. im Bereich Pharmazie, Kosmetik, Umweltanalytik und Ernährung (Brodhäcker 2011).

2.3.1 Spontane Rückmutation

Die spontane Rückmutation der Teststämme zur Histidin-Unabhängigkeit wird bei jedem Mutagenitätstest erfasst. Die Anzahl der spontanen Revertanten pro Platte ist zu bestimmen. Die Kolonien der Revertanten sind deutlich zu erkennen in einem einheitlichen Rasen von auxotrophen Bakterien. Die Hintergrund-Bakterien (Auxotrophen) werden nicht gezählt, aber es wird angenommen, dass ihre Zahl konstant ist, da die Histidin-Konzentration konstant ist. Die Anzahl der Revertanten, die während der 48 h-Inkubation spontan entstehen, ist abhängig von der endgültigen Anzahl der Auxotrophen auf der Platte. Diese Zahl ist eine Funktion der Histidin-Konzentration, die unabhängig von der anfänglichen Zahl der Bakterienzellen ist. Jedoch sind natürliche Mutationen selten, deshalb ist es wichtig, eine große Population der Bakterien im Test vorzufinden. Die maximale Empfindlichkeit ist bei $2 \cdot 10^8$ Zellen erreicht (Ames 1982).

Die spontanen Rückmutationen können zwischen den Experimenten und innerhalb der Platte schwanken. Aus diesem Grund werden für die Kontrollen drei Rückmutationsplatten angefertigt. Die Anzahl der spontanen Rückmutation ist für jeden Teststamm kennzeichnend. Der Teststamm *Salmonella* TA100 hat eine charakteristische spontane Rückmutation von 120 - 200 Revertanten pro Platte. Bei *Salmonella* TA98 hingegen sind nur 30 - 50 Revertanten pro Platte typisch.

Große Abweichungen dieser Zahlen induzieren, dass der genetische Charakter der Teststäme oder das Nährmedium getestet werden müssen. Extrem hohe spontane Revertanten deuten auf eine Fremdverkeimung hin (Ames 1982).

3 Material und Methoden

Die Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Nährböden bzw. -medien wird im Anhang erläutert. Im folgenden Kapitel wird aufgezeigt, woher die entsprechenden Chemikalien, Bestandteile und Teststämme bezogen wurden.

3.1 Material

Die mutierten Bakterienstämme *Salmonella* TA98 (*Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, Serotyp *Typhimurium*; his-frame-shift mutation) und *Salmonella* TA100 (*Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, Serotyp *Typhimurium*; his-missense mutation) stammen aus der Stammsammlung der Universität Göteborg, Schweden (Culture Collection, University of Göteborg, Sweden; <http://ccug.de/>)

Der Bezug von Chemikalien und Nährmedien erfolgte entsprechend der Tab. 1.

Tab. 1: Chemikalien und Nährmedien für die Versuche

Chemikalie/Nährmedium	Hersteller	Reinheit
Casein-Sojapepton-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
D (+) Glucose, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
Magnesiumsulfat, wasserfrei	Merck	
Citronensäure monohydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt	
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	≥99%
Natrium-Ammonium-Hydrogen-Phosphat tetrahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	≥99%
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	≥99%
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt	
L-Histidin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	≥98,5%
D (+) Biotin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	≥98,5%
Ampicillin trihydrate	Fluka Chemie GmbH, Steinheim	
Casein-Soja-Boullion	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
Dimethylsulfoxid DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim	≥99,9%
Methylmethansulfonat (MMS)	Fluka Chemie GmbH, Steinheim	≥98%
2-Nitrofluoren	Sigma-Aldrich, Steinheim	≥98%

Für das Zentrifugieren wurde die Zentrifuge Sigma 3K 30 verwendet.

Die Plasmaelektroden wurden von dem Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. in Greifswald bereit gestellt.

3.2 Aufbau und Gebrauch der Plasmazelle

Für die Plasma-Untersuchungen wurde folgende Anordnung der Plasmazelle verwendet: ein Funktionsgenerator Wobbel-F mit Frequenzzähler, ein Ansteuergerät zum Anschluss an den Funktionsgenerator 4 – 30 V, eine Hochspannungsquelle NP 10000 – 30 DM (230 - 10.000V), sowie eine Oberflächen-DBE-Plasmaquelle (Dielektrisch behinderte Entladung). In Abb. 2 wird die Anordnung einer Plasmazelle exemplarisch dargestellt.

Die Plasmaquelle besteht weiterhin aus einem gasdicht-verschließbaren Raum für die Behandlung von Petrischalen ($d = 55 \text{ mm}$) und einem Gestell zur Fixierung des Reaktors, der Petrischale und der DBE-Elektrode (Vgl. Abb. 3).

Für die Prozentwertregulierung wurde eine Multimeter VC 960 verwendet.

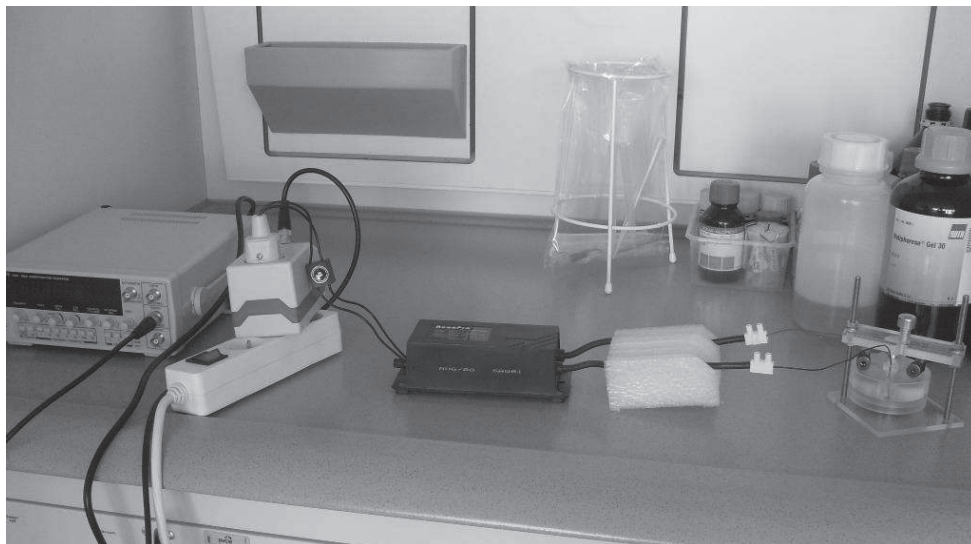


Abb. 2: Anordnung der Plasmazelle im Labor (Rumm 2010)

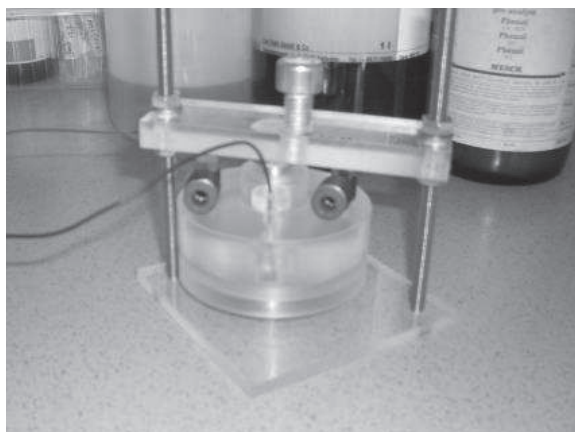


Abb. 3: gasdicht-verschließbarer Reaktor (Rumm 2010)

Mittels dielektrisch behinderter Entladung wird eine Plasmaerzeugung weit ab vom thermischen Gleichgewicht trotz normalen Gasdrucks erzeugt. Durch die angelegte, hochfrequente Wechselspannung entstehen mit jeder Periode winzige Entladungskanäle an anderer Stelle. Die Entladungskanäle bezeichnet man als Steamer, welche nur einem Bruchteil des gesamten Entladungsvolumens entsprechen. Die mittlere Gastemperatur bleibt dadurch in der Entladung niedrig, annähernd bei Raumtemperatur. Für eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus der Plasmaquelle wird auf die Publikation von OEHMING et al. (2010) verwiesen. Eine schematische Darstellung der Plasmaquelle ist in Abb. 4 zu sehen.

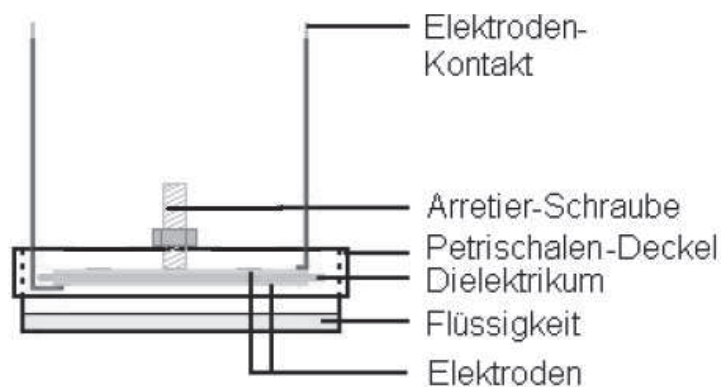


Abb. 4: Schematische Darstellung der Plasmaquelle (Rumm 2010)

Vor Beginn der Plasmabehandlung benötigt der Funktionsgenerator eine Aufwärmphase von 30 Minuten, um die Betriebstemperatur zu erreichen. Im Anschluss wird als Frequenzbereich 1Hz gewählt. Damit die Apparatur mit Wechselstrom betrieben werden kann, muss das Ausgangssignal auf Rechteck geschaltet werden. Über den Drehknopf für die Frequenz wird diese auf 611 mHz eingestellt. Das Multimeter wird am Ausgang 50 Ohm des Funktionsgenerators angeschlossen und ein Prozentwert von 25% einreguliert. Vgl. Abb. 5 zur Veranschaulichung der Prozentwerteinstellung für Wechselstrom.

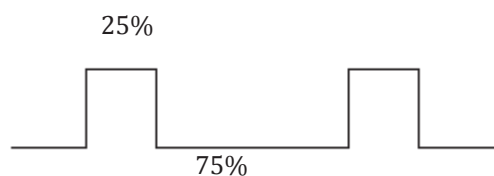


Abb. 5: Ausgangssignal (Rumm 2010)

Nach dem Ausschalten des Multimeters, kann es wieder vom Generator getrennt werden. Das Steuergerät wird an eine Steckerleiste mit Kipp-Funktion angeschlossen und mit dem Funktionsgenerator über den Ausgang TTL/CMOS verbunden. Die DBE-Plasmaelektrode wird an die Plasmaquelle angebracht und mittels zweier Kabel mit der Hochspannungsquelle verbunden.

Außerdem kann die Quelle an das Steuergerät angeschlossen werden und die Plasmazelle ist einsatzbereit. Bei der Generation von Plasma kann es zur Entstehung von Ozon kommen, daher ist es notwendig, die Anordnung mit Ausnahme des Funktionsgenerators unter einem Abzug aufzubauen bzw. zu betreiben (Oehmigen 2010, Rumm 2010). Der Funktionsgenerator muss außerhalb des Abzuges platziert werden, da es bei der Plasmaerzeugung sonst zu Schwankung im Frequenzbereich kommen kann.

Die verwendeten Elektroden (Vgl. Abb. 6) können maximal einer Plasma-behandlung von 30 Minuten ausgesetzt werden, bevor diese regeneriert bzw. gewechselt werden müssen. Die Regeneration erfolgt durch Reinigung mit Aceton und anschließender Lackierung mit Klarlack.

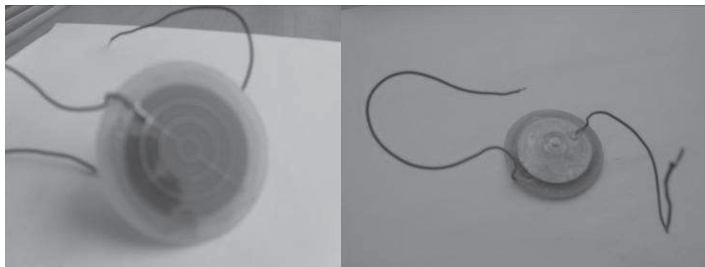


Abb. 6: DBE-Elektrode Unterseite (rechts), Draufsicht (links) (Rumm 2010)

Um die Erzeugung eines Plasmas zu beginnen, muss die Hochspannungsquelle aktiviert sein. Auf der Ober- und Unterseite, sowie zwischen den Elektrodenringen der DBE-Elektrode wird Plasma erzeugt und in Form von UV-Licht (Steamer) sichtbar, siehe Abb. 7. Das Verfahren wird unter Atmosphärendruck durchgeführt, wobei Luft das verwendete Gasmedium darstellt

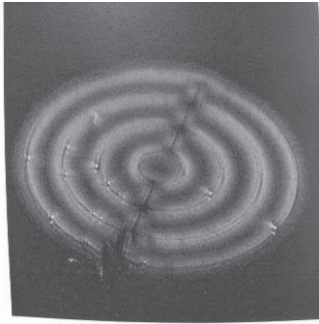


Abb. 7: ausgesendetes UV-Licht an der Unterseite der Elektrode (Steamer) (Oehmigen 2010)

Die Plasmaanordnung wird mit Wechselstrom (rechteckige Signalform) betrieben. Infolgedessen erfolgt die Plasmaeinwirkung auf die Probe in Intervallen. Um die tatsächliche Einwirkzeit des Plasmas zu bestimmen, muss neben der Frequenz auch der eingestellte Prozentwert berücksichtigt werden.

$$f = \frac{1}{T} \quad \left[1\text{Hz} = \frac{1}{\text{s}} \right]$$

Für die Berechnung setzt man die am Funktionsgenerator eingestellte Frequenz von 611 mHz (=0,611 Hz) ein.

$$0,611 \text{ Hz} = 1 / \text{s} \quad | \cdot \text{s}$$

$$0,611 \text{ Hz} \cdot \text{s} = 1 \quad | : 0,611 \text{ Hz}$$

$$\text{s} = 1 / 0,611 \text{ Hz}$$

$$\text{s} = 1,64$$

Entsprechend der Rechnung ist ein Intervall 1,64 s lang. Für einen eingestellten Prozentwert von 25 % ergibt sich eine Plasmaerzeugung pro Intervall von 0,41 s. Eine Behandlungszeit von 1 min. entspricht somit einer Plasmaeinwirkungszeit von 15 s. Hinsichtlich der durchgeführten Versuche kommt man für die Behandlungszeit von 15 min auf eine effektive Einwirkzeit von 3,75 min (3 min und 45 s), bei einer Zeit von 10 min auf 2,5 min (2 min und 30 s) und bei einer Behandlungszeit von 7,5 min auf 1,88 min (1 min und 53 s). Im Verhältnis zu den Gesamtbehandlungszeiten beträgt der Zeitwert für die Plasmaeinwirkung 25 % (Rumm 2010, Oehmigen 2010).

3.3 Anzucht und Vorbereitung der Teststämme

Die Experimente wurden mit Übernachtskulturen der Teststämme *Salmonella* TA100 und *Salmonella* TA98 durchgeführt. Vorbereitete Caso-Boullion wurde mit dem für den jeweiligen Versuch entsprechenden Teststamm mittels Impföse beimpft und über Nacht im Rüttler bei 120 U min^{-1} und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Die Teststämme stammen von Masterplatten aus dem Labor.

Für die Behandlung mit Plasma sollen die Teststämme in ein gepuffertes Medium überführt werden. Die Vorkulturen werden für 10 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 8832 g (8832 fache der Erdbeschleunigung) einer Zentrifugation unterzogen. Der Überschuss Caso-Boullion wird abdekantiert, die konzentrierten Zellen in 25 ml $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH}=7$ aufgenommen und erneut unter gleichen Bedingung zentrifugiert. Der Vorgang wird ein weiteres Mal wiederholt. Abschließend werden die Zellen in exakt 25 ml $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ aufgenommen und sind damit für die Untersuchungen vorbereitet.

3.4 Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Damit eine signifikante Abtötung der Salmonellen durch die Plasmabehandlung ausgeschlossen werden kann, wird jeweils vor und nach den Anwendungen die Gesamtkeimzahl bestimmt. Von den unbehandelten, sowie von den plasmabehandelten Zellen wird eine Verdünnungsreihe (10^1 bis 10^7) mit $0,85 \text{ \% NaCl}$ -Lösung angefertigt.

Mittels Oberflächenausstrichverfahren werden jeweils $100 \text{ }\mu\text{l}$ der 10^4 bis 10^7 Verdünnungen auf Caso-Agar-Platten aufgebracht. Alle Platten werden für 48 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend ausgewertet.

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl erfolgt als Doppelbestimmung.

3.5 Behandlung der Teststämme mit indirekt appliziertem Kaltplasma

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise für die Plasmabehandlung wurde in jeweils 2 Versuchsreihen sowohl mit *Salmonella* TA100, als auch *Salmonella* TA98 durchgeführt.

Die Behandlung der Zellen im gepufferten Medium besteht aus drei Arbeitsschritten. Als erstes werden die hydrophilen Eigenschaften der Mini-Petrischale (d = 55mm) erhöht, damit sich im folgenden Schritt eine dünne Flüssigkeitsschicht über die gesamte Oberfläche der Petrischale bildet. Die Steigerung der Hydrophilie erfolgt durch eine 1-minütige Plasmabehandlung.

Die Hochspannung wird aktiviert und die Plasmaerzeugung beginnt (Kap. 3.2). Nach einer Minute wird die Plasmaerzeugung beendet.

Im zweiten Schritt findet die Plasmabehandlung der Zellen statt. Es werden 3 ml Zellen-Suspension (Zellen in 50 mM Na₂HPO₄) in die Petrischale gegeben und gleichmäßig verteilt, so dass eine einheitliche Flüssigkeitsschicht entsteht. Die Plasmaquelle wird eingeschaltet und nach Ablauf der vorgegebenen Zeit ausgeschaltet. Für die Versuchsreihen wurden 15, 10 und 7,5 Minuten als Zeiten für die Plasmabehandlung ausgewählt.

Nach Beendigung der Plasmaanwendung wird die Plasmaquelle erst nach weiteren 15 Minuten von der Petrischale entfernt, dies stellt den dritten Arbeitsschritt dar.

Anschließend wird die Gesamtkeimzahl der behandelten Zellen bestimmt. Zur Abschätzung der genotoxischen Effekte von Kaltplasma wird der Ames Test herangezogen.

3.6 Abschätzung genotoxischer Effekte mittels Ames Test

Für die Abschätzung der genotoxischen Wirkung von Kaltplasma werden die spontanen, sowie induzierten Rückmutationen der unbehandelten und behandelten Zellen mit Hilfe des Ames Tests ermittelt.

Getrocknete (30 min, 50 °C) und auf Raumtemperatur temperierte Minimal-Glucose-Platten werden vorgelegt. Flüssiger Top-Agar und 0,2 M Na₂HPO₄ werden im Wasserbad bei 50 °C bereitgehalten.

Für die Bestimmung der spontanen Rückmutation werden in ein steriles Reagenzglas nacheinander 0,6 ml 0,2 M Na₂HPO₄, 2 ml Top-Agar und 0,1 ml einer Zellen-Suspension (*Salmonella* TA100 oder TA98) pipettiert, für 5 s geschüttelt (Vortex Reagenzglas Mischer), sofort auf einer Minimal-Glucose-Platte ausgegossen und gleichmäßig verteilt.

Bei der induzierten Rückmutation für den Teststamm *Salmonella* TA100 wird abweichend von der spontanen Rückmutation zuerst 10 µl MMS-Lösung (10 % in DMSO) im sterilen Reagenzglas vorgelegt und 0,2 M Na₂HPO₄ auf 0,59 ml reduziert. Die Zugabe von Top-Agar und Zellen-Suspension, sowie das Auftragen auf die Minimal-Glucose-Platte erfolgen analog.

Für den Teststamm *Salmonella* TA98 ist die induzierte Rückmutation in gleicher Weise durchzuführen. Anstelle der 10 µl MMS-Lösung werden 10 µl 2-Nitrofluorenlösung (1 mg/ml in DMSO) verwendet.

Für die spontane und induzierte Mutation sind jeweils 3 Platten pro Teststamm anzulegen. Die Platten werden für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgewertet.

Bei der Durchführung des Ames Test kommt es auf eine schnelle Arbeitsweise an, da sonst der Top-Agar zu stark abkühlt und erhärtet. Das Gießen am Ende der Arbeitsfolge wird dadurch unmöglich gemacht.

Um die Funktionalität der Teststämme zu überprüfen, wird das gleiche Schema des Ames Test angewendet. Bei dieser Kontrolle sind die unbehandelten Zellen aus der Caso-Boullion und nach der Aufnahme in Puffer zu untersuchen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Bei der Plasmabehandlung von Salmonellen in Natrium-Phosphat-Puffer konnte keine Absenkung des pH-Wertes festgestellt werden. Für die Experimente wurde 50 mM Na₂HPO₄ mit pH = 7 hergestellt. Um eine Änderung des pH-Wertes nach den Plasmaanwendungen zu prüfen, wurde der pH-Wert mittels Teststreifen kontrolliert. Der pH-Wert blieb annähernd stabil. In Untersuchungen von OEHMIGEN et al. (2010) wurde herausgefunden, dass während der indirekten Oberflächenbehandlung mit Kaltplasma eine schrittweise Abnahme des pH-Wertes von 7 auf 2 in ungepufferten Medien z. B. Salzlösungen zu verzeichnen ist. In gepufferten Medien konnte ebenfalls keine Veränderung des pH-Wertes festgestellt werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden von OEHMIGEN et al. (2010) für die Inaktivierung von Mikroorganismen bei der Plasmabehandlung erfasst. In ungepufferten Medien werden die Bakterien schnell und vollständig abgetötet. In gepufferten Medien hingegen beträgt die Reduktion der Mikroorganismen lediglich 1,5 bis 3 Zehnerpotenzen⁴. Um für die vorliegende Bachelorarbeit zur Abschätzung genotoxischer Effekte durch Kaltplasma sicherzustellen, dass es zu keiner Abtötung während der Anwendung kommt, wurde die Gesamtkeimzahl jeweils davor und danach bestimmt. Bei *Salmonella* TA100 befanden sich die Gesamtkeimzahlen sowohl vor als auch nach der Plasmabehandlung im Bereich von 10⁹ KbE/ml. *Salmonella* TA98 wies eine Reduktion um eine Zehnerpotenz von 10⁹ auf 10⁸ KbE/ml nach der Plasmabehandlung auf. Auf die Bewertung des mutagenen Potentials von Kaltplasma hat diese Reduktion keinen Einfluss, da keine signifikante Abtötung vorliegt. Ebenfalls konnte durch die Bestimmung der Gesamtkeimzahl gewährleistet werden, dass die Anzahl der Zellen für die spontane und induzierte Rückmutation (Ames Test) ausreichend ist. Es ist wichtig, eine große Population der Bakterien im Test vorzufinden, da natürliche Mutationen eher selten auftreten. Die maximale Empfindlichkeit für den Ames Test ist bei 2*10⁸ Zellen erreicht. Dieses Kriterium konnte in den durchgeführten Untersuchungen erfüllt werden. Eine Übersicht aller Gesamtkeimzahlen ist in Anhang B (Ergebnisse – Gesamtkeimzahlbestimmung) zu finden.

⁴ Dieses Ergebnis wurde bei einer Plasmabehandlung über 15 Minuten auf ein Volumen von 1,5 ml mit *E.Coli* und *S.aureus* erzielt (Oehmigen 2010).

Aufgrund geringer Rückmutationen in Versuchsreihe 1 mit *Salmonella* TA100 (50 bis 100 Revertanten pro Platte; Tab. 12 - 14 im Anhang) wurde die Funktionalität der Teststämme geprüft. Dafür wurden die spontanen, sowie induzierten Rückmutationen von Zellen direkt aus der Caso-Boullion und nach der Aufnahme in 50 mM Na₂HPO₄ mit Hilfe des Ames Test bestimmt (Kap. 3.6). Für *Salmonella* TA100 lagen die spontanen Rückmutationen bei 129 Revertanten pro Platte (Entnahme aus Na₂HPO₄) bzw. 149 Revertanten pro Platte (Entnahme aus Caso-Boullion), welches charakteristische Werte für diesen Stamm sind. Die induzierten Rückmutationen mit MMS-Lösung (10 % in DMSO) zeigten eine deutliche Erhöhung der Revertanten. Der verwendete Teststamm ist somit in der Lage, mutagene Substanzen zu detektieren. Im Gegensatz dazu zeigte die spontane Rückmutation für *Salmonella* TA98 nur bei den aus der Caso-Boullion entnommenen Zellen eine typische Anzahl an Revertanten (32 Revertanten pro Platte). Die spontane Rückmutation der in Na₂HPO₄ aufgenommenen Zellen lag bei 116 Revertanten pro Platte bzw. konnte aufgrund der hohen Anzahl nicht ausgewertet werden. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine Fremdverkeimung handelt, da ein steriles Arbeiten mit der Zentrifuge bzw. den dafür verwendeten Gefäßen nur bedingt möglich ist. Durch die Erhöhung der Rückmutation bei Zugabe des Mutagens 2-Nitroflouren (induzierte Rückmutation) zeigte sich dennoch, dass der Teststamm *Salmonella* TA98 fähig ist, Stoffe auf ihr mutagenes Potenzial zu untersuchen. Alle Ergebnisse des Funktionalitätstests sind in Tab. 8 - 11 im Anhang festgehalten.

Aufgrund der Annahme einer Fremdverkeimung während der Zentrifugation bzw. der Überführung in 50 mM Na₂HPO₄ wurde in darauffolgenden Versuchen der Top-Agar mit Ampicillin versetzt. Die verwendeten Teststämme sind durch den Besitz des Plasmid pkM101 im Gegensatz zu konventionellen Bakterien resistent gegen Ampicillin. Entgegen den Erwartungen kam es durch die Modifikation des Ames Test durch die Zugabe von Ampicillin zu einer Verhinderung der Rückmutationen der Salmonellen.

Weder auf den Platten von *Salmonella* TA100, noch *Salmonella* TA98 konnten nach der Zugabe von Ampicillin im Top-Agar Revertanten auf den Platten gefunden werden. Lediglich ein Hintergrundrasen war auf den Minimal-Platten zu verzeichnen. Eine Erklärung für diese Erscheinung konnte bisher nicht gefunden werden.

Bei der parallelen Durchführung des Ames Tests sowohl mit als auch ohne Ampicillin im Top-Agar, wurde bestätigt, dass die Bildung von Revertanten durch die Zugabe von Ampicillin im Top-Agar blockiert wird.

Bei der Wiederholung der Versuchsreihen wurden die Vorgaben von MARON und AMES eingehalten (Kap. 3.6).

In den Versuchsreihen mit *Salmonella* TA100 und *Salmonella* TA98 konnten keine genotoxischen Effekte durch die Behandlung mit indirekt appliziertem Kaltplasma festgestellt werden. Die Zahlen der Revertanten in Gegenwart von 0,2 M Na_2HPO_4 lagen für die behandelten Zellen in den charakteristischen Bereichen der spontanen Rückmutation der Teststämme. Für die bessere Bewertung der Rückmutationen wurden die Mutationsindizes gebildet. Es wurden der Mutationsindex, der Mittelwert und die Standardabweichung mit Hilfe von Excel berechnet. Der Mutationsindex stellt das Verhältnis zwischen induzierter und spontaner Rückmutation dar und bietet dadurch Rückschlüsse auf das mutagene Potential einer Substanz oder in diesem Fall des Plasmas. Ab einem Mutationsindex von 2 kann von einer mutagenen Wirkung ausgegangen werden (Steffens). Die Ergebnisse, einschließlich Mittelwerte, Standardabweichungen, sowie Mutationsindizes sind in Tab. 2 für TA100 und in Tab. 3 für TA98 dargestellt.

In Tab. 2 ist zu erkennen, dass die Mutationsindizes für die Plasma behandelten Zellen von *Salmonella* TA100 in Anwesenheit von Na_2HPO_4 und MMS-Lösung in Bezug auf die unbehandelten Zellen zwischen 0,5 und 1,4 liegen. Genotoxische Effekte können in Anbetracht dessen nicht nachgewiesen werden.

Tab. 2: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA100 vor und nach der Plasmabehandlung (15, 10, 7,5 Minuten; Versuchsreihe 2)

19.01.12		Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
ohne Plasma	Puffer 1	133	138	7,6	
		147			
		135			
	MMS (10%); 10µl/Platte)	1890	2247	464,4	
		2772			
2079					
15 min. Plasma	Puffer 1	212	193	16,5	1,4
		185			
		182			
	MMS (10%); 10µl/Platte)	747	1126	556,0	0,5
		866			
		1764			
10 min. Plasma	Puffer 1	213	184	27,0	1,3
		178			
		160			
	MMS (10%); 10µl/Platte)	2772	1995	708,1	0,9
		1827			
		1386			
7,5 min. Plasma	Puffer 1	160	169	7,6	1,2
		172			
		174			
	MMS (10%); 10µl/Platte)	964	1728	668,6	0,8
		2205			
		2016			

Für *Salmonella* TA98 weisen die Mutationsindizes (Tab. 3) im Vergleich zu *Salmonella* TA100 eine leichte Erhöhung auf. Die Werte liegen zwischen 1,4 bis 2,2. Hinsichtlich der Werte ab 2,0 könnte eine DNA verändernde Wirkungen durch Kaltplasma angenommen werden. Diese Ergebnisse konnten in einer zweiten Versuchsreihe (Tab. 15 - 17 im Anhang) jedoch nicht bestätigt werden, da dort die Werte für die Mutationsindizes zwischen 0,4 und 1,4 lagen.

Tab. 3: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA98 vor und nach der Plasmabehandlung (15, 10, 7,5 Minuten; Versuchsreihe 1)

26.01.12		Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
ohne Plasma	Puffer 1	9	13	3,6	
		14			
		16			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	1134	1302	524,6	
		1890			
		882			
15 min. Plasma	Puffer 1	30	24	5,5	1,8
		21			
		20			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	3780	2898	786,9	2,2
		2646			
		2268			
10 min. Plasma	Puffer 1	20	22	4,9	1,7
		19			
		28			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	2520	2541	787,7	2,0
		3339			
		1764			
7,5 min. Plasma	Puffer 1	28	20	7,2	1,5
		15			
		16			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	1827	1785	254,6	1,4
		2016			
		1512			

Für die signifikanten Unterschiede der Indizes kommen verschiedene Ursachen in Frage. Zum einen ist es laut OEHMIGEN et al. (2010) möglich den Abstand der DBE-Elektrode zur Petrischale zwischen 2 bis 5 mm zu variieren. Aufgrund einer defekten Schraube konnte der Zwischenraum in den Durchführungen nicht exakt und für alle Experimente einheitlich eingestellt werden.

Zum anderen wurden die Elektroden nach einer Einsatzzeit von 30 Minuten mittels Klarlack regeneriert (Kap. 3.2). Es ist bekannt, dass der aufgetragene Lack durch die Plasmaerzeugung weg geätzt wird. Welche weiteren Reaktionen dadurch entstehen, ist jedoch bisher nicht untersucht worden. Ferner ist die Entstehung reaktiver Moleküle bzw. Verbindungen durch das Abtragen der Lackschicht ungeklärt.

Um die Behauptung zu bestätigen, dass indirekt appliziertes Kaltplasma keine genotoxischen Effekte auslöst, müssen weitere Betrachtungen vorgenommen werden. OEHMIGEN, RAUSCHER et al. belegen bereits, dass Plasma biologisch wirksame Effekte auslösen kann. Die Befunde von RAUSCHER et al. (2009) basieren vorwiegend auf der bakteriziden Wirkung von UV-Strahlen, die bei der Plasma-Entladung entstehen. In einer Studie von Hähnel et al. (2009), die mit der gleichen Plasmavorrichtung arbeiteten, wie in der vorliegenden Arbeit, konnten Emissionen im UV-C Bereich unter 280 nm nicht detektieren. Der Einfluss entstehender UV-Strahlen für genotoxische Effekte kann hier somit außer Acht gelassen werden.

Die Entstehung reaktiver Spezies während der Atmosphärendruck-Luft-Plasmaerzeugung soll laut OEHMIGEN et al. (2010) eine bedeutsamere Rolle zugeschrieben werden. OEHMIGEN et al. (2010) stellt einerseits heraus, dass die Senkung des pH-Wertes in ungepufferten Medien als Folge der Bildung reaktiver Stickstoff-Spezies zu verzeichnen ist. Andererseits, dass „reaktive Sauerstoff-Spezies für die antimikrobielle Aktivität notwendig sind“ (Oehmigen 2010).

Da in der vorliegenden Arbeit bei einem stabilen pH-Wert gearbeitet wurde, könnte eine genotoxische Wirkung hauptsächlich von den reaktiven Sauerstoffverbindungen und -molekülen ausgehen. Aufgrund dessen ist in weiteren Experimenten zu untersuchen, welche Rolle das Arbeiten in einem neutralen, stabilen pH-Wert spielt. Dafür sind Untersuchungen mit derselben Versuchsdurchführung wie in der vorliegenden Arbeit anzulegen, wobei zum einen der pH-Wert des Puffers variiert wird und zum anderen die Durchführung mit einem ungepufferten Medium erfolgt.

In Anbetracht der eingesetzten Plasmastärken und Einwirkungsauern ist weiterführend auch die Relation zwischen eliminierenden und mutagenen Effekten der Plasmabestrahlung von Interesse.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Abschätzung genotoxischer Effekte durch Kaltplasma. Ziel dabei war es, das mutagene Potential von indirekt appliziertem Kaltplasma mit Hilfe des Ames Test zu bestimmen.

Dafür wurden die Histidin-auxotrophen Teststämme *Salmonella* TA100 und *Salmonella* TA98 in ein gepuffertes Medium (50 mM Natriumphosphatpuffer) überführt und einer Plasmabehandlung von 15, 10 und 7,5 Minuten unterzogen. Um eine signifikante Abtötung durch Plasma auszuschließen, wurden jeweils vor und nach der Plasmabehandlung die Gesamtkeimzahlen mittels Oberflächenausstrichverfahren ermittelt. Für die Bewertung genotoxischer Effekte wurden die Rückmutationen nach MARON und AMES in Gegenwart von 0,2 M Natriumphosphatpuffer und einer mutagenen Substanz gebildet. Aufgrund geringer Rückmutationen in der ersten Versuchsreihe mit *Salmonella* TA100 wurde zusätzlich die Funktionalität beider Teststämme vor und nach der Aufnahme in 50 mM Natriumphosphatpuffer geprüft.

Für die durchgeführten Plasmabehandlungen konnte keine signifikante Reduktion der Zellenanzahl festgestellt werden. Auch die Funktionalität der Teststämme wurde nicht merklich beeinträchtigt.

Genotoxische Effekte durch Kaltplasma konnten innerhalb der Versuchsreihen nicht nachgewiesen werden. Eine mutagene Wirkung von Kaltplasma kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Da es einige Hinweise auf einen substanziellen Zusammenhang zwischen der Kaltplasmabestrahlung und dem Verhalten der Testzellen gibt, bedarf es weitere Untersuchungen, um ein endgültiges Ergebnis zu erhalten. Aspekte, die in die weitere Forschung einfließen sollten, wäre zum einen die Variation des pH-Wertes als Parameter für den Abtötungsgrad der Zellen, der durch die Kaltplasmabestrahlung erreicht werden kann. Zum anderen ist unter stabil gehaltenen pH-Werten die Relation eines eliminierenden bzw. deaktivierenden Effektes im Verhältnis zum mutagenen Effekt als Kerngröße genauer zu betrachten.

Die Aufklärung der Funktionsmechanismen ist Grundlage für einen langfristigen Einsatz der Kaltplasmatechnik in praktischen oder praxisnahen Anwendungen der Sterilisation und Dekontamination.

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
C	Cytosin
Caso	Casein-Soja
d	Durchmesser
DBE	dielektrisch behinderte Entladung
DMSO	Dimethylsulfoxid
G	Guanin
gew. MW.	gewichteter Mittelwert
KbE/ml	koloniebildende Einheiten pro Milliliter
l	Länge
Mi	Mutationsindex
MMS	Methylmethansulfonat
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Puffer 1	0,2 M Natriumhydrogenphosphat
Puffer 2	50 mM Natriumhydrogenphosphat
St.Ab.	Standardabweichung
T	Thyamin
UV – Strahlen	Ultraviolette Strahlen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Salmonella Typhimurium</i>	11
Abb. 2: Anordnung der Plasmazelle im Labor	19
Abb. 3: gasdicht-verschließbarer Reaktor	19
Abb. 4: Schematische Darstellung der Plasmaquelle	20
Abb. 5: Ausgangssignal	20
Abb. 6: DBE-Elektrode Unterseite (rechts), Draufsicht (links)	21
Abb. 7: ausgesendetes UV-Licht an der Unterseite der Elektrode (Steamer)	22

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien und Nährmedien für die Versuche	18
Tab. 2: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA100 vor und nach der Plasmabehandlung (15, 10, 7,5 Minuten; Versuchsreihe 2).....	29
Tab. 3: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA98 vor und nach der Plasmabehandlung (15, 10, 7,5 Minuten; Versuchsreihe 1).....	30
Tab. 4: Gesamtkeimzahlen der Versuchsreihe 1 mit <i>Salmonella</i> TA100.....	41
Tab. 5: Gesamtkeimzahlen der Versuchsreihe 2 mit <i>Salmonella</i> TA100.....	41
Tab. 6: Gesamtkeimzahlen der Versuchsreihe 1 mit <i>Salmonella</i> TA98	41
Tab. 7: Gesamtkeimzahlen der Versuchsreihe 2 mit <i>Salmonella</i> TA98	41
Tab. 8: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA100.....	42
Tab. 9: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA100 „gewaschen“	42
Tab. 10: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA98.....	42
Tab. 11: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA98 „gewaschen“	42
Tab. 12: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA100 vor und nach der Plasmabehandlung von 15 Minuten (Versuchsreihe 1).....	43
Tab. 13: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA100 vor und nach der Plasmabehandlung von 10 Minuten (Versuchsreihe 1).....	43
Tab. 14: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA100 vor und nach der Plasmabehandlung von 7,5 Minuten (Versuchsreihe 1).....	43
Tab. 15 Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA98 vor und nach der Plasmabehandlung von 15 Minuten (Versuchsreihe 2).....	44
Tab. 16: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA98 vor und nach der Plasmabehandlung von 10 Minuten (Versuchsreihe 2).....	44
Tab. 17: Spontane und induzierte Rückmutation von <i>Salmonella</i> TA98 vor und nach der Plasmabehandlung von 7,5 Minuten (Versuchsreihe 1).....	44

Literaturverzeichnis

- Ames, B.N., Maron, D.M.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Nr. 113 (1982), S. 173-215.
- Berthold, E. :Untersuchung des mutagenen Potentials von Alkylphosphaht Ionic Liquids. Diplomarbeit, Neubrandenburg, 2009.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung: Plasmatechnik: Prozessvielfalt und Nachhaltigkeit. Bonn, Mai 2000.
- Brodhacker, S., Fethke, S., Fuschlbeger, V., Gerike, S., Hagenstein-Helle, K., Hiffemann, L., Jensch, F., Kasdorf, C., Kizina, M., Loosch, T., Mack, E., Mook, C., Petrowskie, R., Schütt, M., Schulz, M., Teichmann, E. : Vergleichende Untersuchung der Mutagenität von Rußrückständen aus Mineralöl und Biodiesel mit Hilfes des "Salmonella Reverse Mutation Test" (Ames Test). Hochschule Neubrandenburg, 2011.
- Fuchs, G. (Hrsg.): Allgemeine Mikrobiologie. 8. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme, 2007.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., Ellenberger, T.: DNA Repair and Mutagenesis. 2. Aufl. Washington: American Society of Microbiology, 2006.
- Graw, J.: Genetik. 4. Aufl. . Berlin; Heidelberg: Springer, 2006.
- Henning, W.: Genetik. 2. Aufl. Berlin; Heidelberg: Springer, 1998.
- Kylian, O., Hasiwa, M., Rossi, F.: Plasma-Based De-Pyrogenization. *Plasma Processes and Polymers* (2006), S. 272-275.
- Kim, Seong-Mi Kim and Jong-Il.: Decomposition of Biological Macromolecules by Plasma Generated with Helium and Oxygen. *The Journal of Microbiology* 44 (2006), Nr. 4, S. 466-471.
- Krämer, J.: Lebensmittel-Mikrobiologie. 5. Aufl. Stuttgart: Eugen Ulmer KG, 2007.
- Munk, K. (Hrsg.): Grundstudium Biologie: Mikrobiologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2001.
- McCann, J., Spingarn, N.E., Kabori, J., Ames, B.N.: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72 (1975), Nr. 3, S. 979-983.

- Oehmigen, K, Hähnel, M, Brandenburg, R, Wilke, Ch., Weltmann, K.D., Von Woedkte, Th.: The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. *Plasma Processes and Polymers* (2010), S. 250-257.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W.: *Mikrobiologisches - biochemisches Praktikum*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme, 1999.
- Seyffert, W.: *Lehrbuch der Genetik*. 2. Aufl. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- Shanabruch, W.G, Walker, G.C.: Localization of the Plasmid (pKMI01) Gene(s) Involved in *recA + lexA +-Dependent Mutagenesis*. *Molecular and general genetics* (1980), S. 289-297.
- Stead, A.G, Hasselblad, V., Creason, J.P., Claxton, L.: Modeling the Ames Test. *Mutation Research* 85 (1981), S. 13-27.
- Steinbüchel, A., Oppermann-Sanio, F.B.. *Mikrobiologisches Praktikum*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003.
- Stroth, U.: *Plasmaphysik*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, Springer Fachmedien, 2011.
- Rumm, M.: *Aufbau und Anwendung einer Plasmazelle zur Kaltinaktivierung von Mikroorganismen*. 2. Studienarbeit. Neubrandenburg, 2010.
- Rauscher, H., Kylian, O., Benedikt, J., Von Keudel, A., Rossi, F.: *Elimination of Biological Contaminations from Surfaces by Plasma Discharges: Chemical Sputtering*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.
- Wallhäußer, K.H.: *Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung: Keimidentifizierung - Betriebshygiene*. 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme, 1995.
- Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. www.inp-greifswald.de. 02.02.2012.
- TechPortal Plasmatechnologie.
<http://www.techportal.de/de/88/4/lexikon,public,lexilist,0/95/>. 03.02.2012.
- RÖMPP Online. <http://www.roempp.com/prod/>. Georg Thieme Verlag 03.02.2012.
- Prof. Dr. Steffens K., persönliche Informationsübermittlung

Anhang

A Rezepturen

Caso-Boullion – Anzucht der Vorkulturen

25 ml

- 0,75 g Caso-Boullion
- 25 ml dest. H₂O

Caso-Boullion in 100 ml Erlenmeyerkolben geben und mit 25 ml dest. H₂O auffüllen. Für 15 min bei 121°C sterilisieren. Anschließend 79µl Ampicillin-Lösung (8 mg/ml) dazugeben.

Caso-Agar - Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Nach Hersteller: 40 g Caso-Agar je Liter, anschließend 15 min bei 121°C autoklavieren. Es empfiehlt sich 2 Flaschen je 0,5 l zu verwenden.

Top-Agar - Mutagenitätstest

100 ml

- 0,6 g Agar-Agar
- 0,5 g Natriumchlorid (NaCl)
- 70 ml dest. H₂O
- 10 ml 0,5 mM Biotin-Histidin-Lösung

Agar-Agar und NaCl in ein Becherglas geben und unter Rühren (Rührfisch) lösen und auf 100 ml auffüllen. In 250-ml Laborflasche füllen und für 15 min bei 121°C autoklavieren. Anschließend 10 ml 0,5 mM Biotin-Histidin-Lösung dazu geben.

0,5 mM Histidin-Biotin-Lösung

100 ml

- 7,75 mg L-Histidin
- 12,2 mg Biotin
- 70 ml dest. H₂O

Histidin und Biotin exakt einwiegen, lösen und auf 100 ml auffüllen. Anschließend für 15 min bei 121°C autoklavieren.

40%-Glucose-Lösung

100 ml

- 40 g Glucose, wasserfrei
- 70 ml dest. H₂O

Glucose in dest. H₂O lösen und auf 100 ml auffüllen. Im Anschluss 15 min bei 121°C autoklavieren.

Vogel-Bonner-Medium (25x)

200ml

- 0,485 g Magnesiumsulfat (MgSO₄)
- 10 g Zitronensäure monohydrat
- 50 g di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)
- 17,5 g Natrium-Hydrogen-Ammonium-Phosphat (NaH₂NH₄(PO₄*4H₂O))
- 160 ml dest. H₂O (45°C)

Die Salze in der vorgegebenen Reihenfolge in das warme Wasser (dest. H₂O) geben. Jedes Salz muss zunächst vollständig aufgelöst sein bis das nächste Salz hinzugegeben wird. Anschließend auf 200 ml mit dest. H₂O auffüllen und autoklavieren (15 min, 121°C).

Minimal-Glucose-Medium - Mutagenitätstest

1 Liter

- 15 g Agar-Agar
- 910 ml dest. Wasser
- 40 ml VB-Salz (25x) (steril)
- 50 ml 40%-Glucose-Lösung (steril)

Zunächst Agar-Agar in 910 ml dest. H₂O lösen (mit Rührfisch) und für 15 min bei 121°C sterilisieren. Nach der Sterilisation auf etwa 50°C abkühlen lassen und auf dem Magnetprüher VB-Salz und Glucose-Lösung dazugeben.

Für die Zugabe von VB-Salz und Glucose-Lösung werden je ein steriler Messzylinder benötigt.

0,2 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH=7,4)

250 ml

- 7,1 g Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
- 190 ml dest. H_2O
- 5 %ige Phosphorsäure H_3PO_4

Na_2HPO_4 in dest. H_2O lösen, pH-Wert bestimmen und mit H_3PO_4 auf 7,4 einstellen. Auf 250 ml auffüllen und sterilisieren (15 min, 121°C).

50 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH=7)

200 ml

- 50 ml 0,2 M Na_2HPO_4 -Puffer
- 5 %ige Phosphorsäure H_3PO_4

Mittels pH-Meter den pH-Wert des 0,2 M Na_2HPO_4 -Puffers bestimmen und mit H_3PO_4 auf pH=7 einstellen. Anschließend auf 200 ml mit dest. H_2O auffüllen. Für 15 min bei 121°C sterilisieren.

Ampicillin-Lösung (8mg/ml)

100ml

- 800 mg Ampicillin trihydrat
- 2 ml 1N Natriumhydroxid (NaOH)
- 100 ml dest. H_2O

Die Bestandteile mischen und abfüllen, die Lösung muss nicht autoklaviert werden.

10% MMS- Lösung

- 100 μl Methylmethansäuresulfonat (MMS)
- 900 μl Dimethylsulfoxid (DMSO)

Die Bestandteile mischen, nicht autoklavieren.

2-Nitrofluoren-Lösung (1 mg/ml)

- 1 mg 2-Nitrofluoren
- 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

2-Nitrofluoren in DMSO lösen, nicht autoklavieren.

0,85 % NaCl-Lösung

1000 ml

- 8,5 g NaCl
- 1000 ml dest. H₂O

Natriumchlorid in dest. H₂O lösen und je 9 ml in Reagenzgläsern abfüllen. Reagenzgläser verschließen und 15 min bei 121 °C autoklavieren.

Top-Agar mit Ampicillin - Mutagenitätstest

50 ml

- 0,3 g Agar-Agar
- 0,25 g Natriumchlorid (NaCl)
- 30 ml dest. H₂O
- 5 ml 0,5 mM Biotin-Histidin-Lösung
- 0,172 ml Ampicillin Lösung (8mg/ml)

Agar-Agar und NaCl in ein Becherglas geben und unter Rühren (Rührfisch) lösen und auf 50 ml auffüllen. In 100-ml Laborflasche füllen und für 15 min bei 121 °C autoklavieren. Anschließend 5 ml 0,5 mM Biotin-Histidin-Lösung, sowie 0,172 ml Ampicillin Lösung dazu geben.

B Ergebnisse

Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Tab. 4: Gesamtkeimzahlen der Versuchsreihe 1 mit *Salmonella* TA100

	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	gew. MW	KbE/ml
UB	n.a.	922	402	76		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1261,3	1,3*10⁹
15 min	n.a.	n.a.	n.a.	91		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	91	9,1*10⁹
10 min	n.a.	1152	147	53		
	n.a.	1170	196	104	1271,2	1,3*10⁹
7,5 min	n.a.	n.a.	n.a.	100		
	n.a.	n.a.	n.a.	64	82	8,2*10⁹

Tab. 5: Gesamtkeimzahlen der Versuchsreihe 2 mit *Salmonella* TA100

	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	gew.MW	KbE/ml
UB	n.a.	5985	403	82		
	n.a.	6111	410	62	5879,7	5,9*10⁹
15 min	n.a.	4284	350	54		
	n.a.	3213	331	44	3737,9	3,7*10⁹
10 min	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
7,5 min	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-

Tab. 6: Gesamtkeimzahlen der Versuchsreihe 1 mit *Salmonella* TA98

	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	gew.MW	KbE/ml
UB	n.a.	n.a.	n.a.	35		
	n.a.	n.a.	n.a.	38	36,5	3,7*10⁹
15 min	1827	399	100	6		
	n.a.	n.a.	n.a.	42	2134,9	2,1*10⁸
10 min	2079	281	43	13		
	n.a.	n.a.	57	14	2216,6	2,2*10⁸
7,5 min	3339	324	42	18		
	n.a.	n.a.	44	n.a.	3387,3	3,4*10⁸

Tab. 7: Gesamtkeimzahlen der Versuchsreihe 2 mit *Salmonella* TA98

	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	gew.MW	KbE/ml
UB	n.a.	756	101	13		
	n.a.	441	113	n.a.	644,3	6,4*10⁸
15 min	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
10 min	n.a.	n.a.	66	3		
	n.a.	n.a.	49	n.a.	56,2	5,6*10⁸
7,5 min	n.a.	n.a.	51	7		
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	52,7	5,3*10⁸

FunktionalitätstestTab. 8: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA100

06.01.12	Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
Puffer 1	165	148	13,9	
	131			
	147			
MMS (10%); 10µl/Platte)	4457	4473	97,4	30,3
	4599			
	4362			

Tab. 9: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA100 „gewaschen“

06.01.12	Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
Puffer 1	116	129	11,1	
	127			
	143			
MMS (10%); 10µl/Platte)	2993	2211	558	10
	1906			
	1733			

Tab. 10: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA98

09.01.12	Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
Puffer 1	46	32	10,7	
	31			
	20			
2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	434	1551	1677	48,0
	298			
	3921			

Tab. 11: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA98 „gewaschen“

09.01.12	Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
Puffer 1	116	116	0,0	
	n.a.			
	n.a.			
2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	2804	2226	954	10
	881			
	2993			

Bestimmung der Mutationsraten - Plasmabehandlung

Tab. 12: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA100 vor und nach der Plasmabehandlung von 15 Minuten (Versuchsreihe 1)

07.12.11		Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
ohne Plasma	Puffer 1	50	68	28,6	
		53			
		101			
	MMS (10%); 10µl/Platte	136	139	12,8	
		153			
		128			
15min. Plasma	Puffer 1	101	91	11,8	1,3
		78			
		94			
	MMS (10%); 10µl/Platte	127	125	4,7	0,9
		129			
		120			

Tab. 13: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA100 vor und nach der Plasmabehandlung von 10 Minuten (Versuchsreihe 1)

13.12.11		Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
ohne Plasma	Puffer 1	96	68	27,5	
		41			
		68			
	MMS (10%); 10µl/Platte	69	67	8,2	
		58			
		74			
10 min. Plasma	Puffer 1	90	81	10,7	1,2
		69			
		83			
	MMS (10%); 10µl/Platte	100	81	32,6	0,6
		43			
		99			

Tab. 14: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA100 vor und nach der Plasmabehandlung von 7,5 Minuten (Versuchsreihe 1)

13.12.11		Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
ohne Plasma	Puffer 1	108	103	4,5	
		99			
		103			
	MMS (10%); 10µl/Platte	83	83	4,0	
		87			
		79			
7,5 min Plasma	Puffer 1	204	167	37,0	2,5
		130			
		167			
	MMS (10%); 10µl/Platte	100	84	13,8	0,6
		74			
		79			

Tab. 15 Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA98 vor und nach der Plasmabehandlung von 15 Minuten (Versuchsreihe 2)

27.01.12		Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
ohne Plasma	Puffer 1	22	26	3,2	
		28			
		27			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	2583	2142	607,5	
		2394			
		1449			
15 min. Plasma	Puffer 1	12	10	2,0	0,4
		8			
		10			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	1638	1827	166,7	0,9
		1953			
		1890			

Tab. 16: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA98 vor und nach der Plasmabehandlung von 10 Minuten (Versuchsreihe 2)

27.01.12		Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
ohne Plasma	Puffer 1	22	26	3,2	
		28			
		27			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	2583	2142	607,5	
		2394			
		1449			
10 min. Plasma	Puffer 1	37	37	4,0	1,4
		41			
		33			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	2772	2457	350,8	1,1
		2520			
		2079			

Tab. 17: Spontane und induzierte Rückmutation von *Salmonella* TA98 vor und nach der Plasmabehandlung von 7,5 Minuten (Versuchsreihe 1)

27.01.12		Revertanten	MW	St.Ab.	Mi
ohne Plasma	Puffer 1	22	26	3,2	
		28			
		27			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	2583	2142	607,5	
		2394			
		1449			
7,5 min. Plasma	Puffer 1	30	26	3,2	1,0
		25			
		24			
	2-Nitrofl. (1mg/ml); 10µl/Platte)	2268	1827	560,0	0,9
		1197			
		2016			

Eigenständigkeitserklärung

Studiengang: Bioprodukttechnologie

Fachgebiet: Mikrobiologie

Name: Christin Hackethal

Thema: Abschätzung genotoxischer Effekte durch Kalt-Plasma mit Hilfe des „Reverse *Salmonella* Mutagenicity Assay“ (Ames Test)

Eidesstattliche Erklärung zur Bachelorarbeit

Ich versichere, das ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig und ohne unerlaubter Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in gleicher oder ähnlicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift