

## PlaWaKiRi – „Der Einsatz von Plasmawasser gegen Klaueninfektionen beim Rind“

**Registriernummer:** 276 03 254 021 0329

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst

Vanessa Große-Peclum (wiss. Bearbeitung)

Dr. Lisa Siekmann (wiss. Leitung)

PD Dr. Carsten Krischek (wiss. Leitung)

Prof. Dr. Madeleine Plötz (Direktorin, wiss. Leitung)

Christian Ochs (wiss. Bearbeitung)

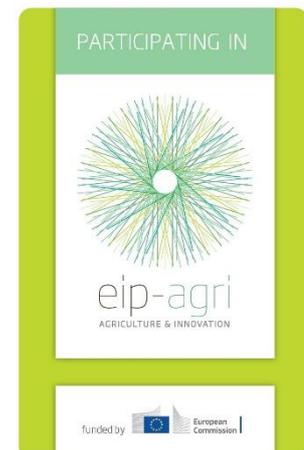
Marcus Harms (wiss. Bearbeitung)

Dr. Lars ten Bosch (wiss. Leitung)

Dr. Georg Avramidis (wiss. Leitung / Koordination)

Prof. Dr. Wolfgang Viöl (Projektleitung / wiss. Leitung)

**Berichtszeitraum:** 01. Mai 2020 – 30. Juli 2023



# Inhaltsverzeichnis

1.	KURZDARSTELLUNG .....	4
1.1.	Ausgangssituation und Bedarf.....	4
1.2.	Projektziel und konkrete Aufgabenstellung .....	4
1.3.	Mitglieder der OG.....	5
1.4.	Projektgebiet.....	5
1.5.	Projektlaufzeit und Dauer.....	5
1.6.	Budget .....	5
1.7.	Ablauf des Verfahrens .....	6
1.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	7
2.	EINGEHENDE DARSTELLUNG.....	9
2.1.	Verwendung der Zuwendung .....	9
2.1.1.	Gegenüberstellung Geschäftsplan und tatsächlich durchgeführte Teilschritte .....	9
2.1.2.	Darstellung der wichtigsten finanziellen Positionen .....	16
2.2.	Detaillierte Erläuterung der Situation zu Projektbeginn.....	17
2.2.1.	Ausgangssituation .....	17
2.2.2.	Projektaufgabenstellung .....	17
2.3.	Ergebnisse der OG in Bezug auf .....	18
2.3.1.	Wie wurde die Zusammenarbeit im Einzelnen gestaltet? .....	18
2.3.2.	Was war der besondere Mehrwert bei der Durchführung des Projektes als OG? .....	19
2.3.3.	Ist eine weitere Zusammenarbeit der Mitglieder der OG nach Abschluss des geförderten Projektes vorgesehen?.....	19
2.4.	Ergebnisse des Innovationsprojektes .....	19
2.4.1.	Zielerreichung.....	19
2.4.2.	Abweichung zwischen Planung und Ergebnis.....	20
2.4.3.	Projektverlauf.....	21

<b>2.4.4.</b>	<b>Beitrag des Ergebnisses zu förderpolitischen EIP-Themen .....</b>	<b>81</b>
<b>2.4.5.</b>	<b>Nebenergebnisse.....</b>	<b>81</b>
<b>2.4.6.</b>	<b>Arbeiten, die zu keinem Ergebnis geführt haben .....</b>	<b>82</b>
<b>2.4.7.</b>	<b>Mögliche weitere Verwendung von Investitionsgütern .....</b>	<b>82</b>
<b>2.5.</b>	<b>Nutzen der Ergebnisse für die Praxis .....</b>	<b>82</b>
<b>2.6.</b>	<b>Verwertung und Nutzung der Ergebnisse .....</b>	<b>82</b>
<b>2.7.</b>	<b>Wirtschaftliche und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit.....</b>	<b>83</b>
<b>2.8.</b>	<b>Kommunikations- und Disseminationskonzept .....</b>	<b>84</b>

# 1. Kurzdarstellung

## 1.1. Ausgangssituation und Bedarf

Die Milchkuhhaltung ist in Niedersachsen ein wichtiger Wirtschaftsfaktor. Jedoch stellt die Wahrung des Wohlbefindens und der Gesundheit der hochleistenden Tiere eine immense Herausforderung dar. Seit Jahren sind die Abgangsursachen bei Milchrindern unverändert: Fruchtbarkeitsprobleme (ca. 18 %), verminderte Eutergesundheit (ca. 14 %) und Klauen- bzw. Gliedmaßenprobleme (ca. 14 %) sind die relevantesten drei Ursachen. Eine der wichtigsten infektiösen Klauenerkrankungen ist die *Dermatitis digitalis* (*DD*, Erdbeerkrankheit, Mortellaro'sche Krankheit). Diese ist mit ca. 20 % aller Fälle die häufigste Lahmheitsursache und wird mit einer Vielzahl von Keimen assoziiert (v.a. anaerobe Mikroorganismen, wie *Fusobacterium spp.*, *Porphyromonas spp.* und *Treponema spp.*). Therapiert wird gegebenenfalls mehrmals lokal mit einem Antibiotikaspray (z.B. Oxytetracyclin, Chlortetracyclin). Klauenbäder werden vor allem zur Herdenbehandlung eingesetzt, die aber zum Teil antibiotikahaltig sind oder deren umweltunverträgliche Inhaltsstoffe mittlerweile verboten sind (Kupfersulfat) und gesondert entsorgt werden müssen und/oder zu Schleimhautreizungen führen können (Formaldehyd). Werden Arzneimittel aufgrund eines Therapienotstandes umgewidmet, muss unbedingt die Wartezeit von 7 Tagen auf die Milch und 28 Tagen auf das Fleisch der behandelten Kühe eingehalten werden.

Der Einsatz von Plasmaverfahren kann eine umweltschonende und kostengünstige Alternative zur Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen darstellen. Bei Verwendung eines technischen Plasmas werden durch Anlegen einer elektrischen Spannung an metallene Elektroden aus der umgebenden Luft und ihren Bestandteilen (Sauerstoff, Stickstoff etc.) u.a. Ionen, hochreaktive kurzlebige Stick- und Sauerstoffradikale und kurzweilige Strahlung gebildet, die direkt appliziert bzw. bei Kontakt mit Flüssigkeiten ihre mikrobizide Wirkung entfalten. Die Anwendung soll dazu beitragen, den Einsatz von Antibiotika und Bioziden in der Therapie der *DD* zu verringern bzw. vermeidbar zu machen. Es kann damit ein wesentlicher Beitrag für die Verbesserung der Tiergesundheit und des Tierwohls sowie zur Senkung des Einsatzes von Medikamenten - insbesondere Antibiotika - in der Rinderhaltung geliefert werden.

## 1.2. Projektziel und konkrete Aufgabenstellung

Zielsetzung des geplanten Projektes „PlaWaKiRi“ war es, ein plasmagestütztes Verfahren zur Therapie der *DD* zu entwickeln und die Einsatzmöglichkeiten unter Praxisbedingungen zu testen. Zu Beginn wurde das Projekt überwiegend an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) und an der Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst (HAWK) bearbeitet. Hier ist zunächst ein sogenanntes TRIS-gepuffertes Plasma-aktiviertes Wasser (Tb-PAW) auf seine Reduktionsfähigkeit gegenüber ausgewählten Mikroorganismen und unter verschiedenen Einflussfaktoren (Lagerung, Temperatur, Proteine) getestet worden. In der zweiten Hälfte der Projektlaufzeit sollten die Arbeiten überwiegend in den Stallungen des

landwirtschaftlichen Mitglieds Borchardt der OG ausgeführt werden, wo beabsichtigt war, anhand von Feldversuchen die Anwendbarkeit und die Nutzbarkeit des Tb-PAWs zu testen. Während des Verlaufs des Projektes hat sich jedoch ergeben, dass die Ergebnisse im Labor (in vitro) noch nicht ausreichend waren, um eine positive Beantragung eines Tierversuchsantrages zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde das Ziel neu ausgerichtet und v.a. auf die Verträglichkeit von Tb-PAW und Zellen gelenkt. Um weiterhin eine Einbindung des Landwirts zu gewährleisten, wurden regelmäßige Besuche im Betrieb mit Beurteilung der Klauengesundheit und Austausch mit den Klauenpflegern anvisiert. Um die Hygiene der Klauen zu verbessern, wird inzwischen auch ein Roboter zur Reinigung der Laufflächen der Tiere eingesetzt.

### **1.3. Mitglieder der OG**

Insgesamt waren drei Mitglieder an der OG beteiligt. Die HAWK fungierte in diesem Projekt als Koordinator. Darüber hinaus war die Stiftung Tierärztliche Hochschule über das Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit (LMQS) sowie die Klinik für Rinder Teil der OG. Das 3. OG-Mitglied war der landwirtschaftliche Betrieb BG Borchardt GBR aus dem Bereich der Urproduktion.

### **1.4. Projektgebiet**

Alle beteiligten wissenschaftlichen Einrichtungen, sowie der landwirtschaftliche Betrieb befinden sich in Niedersachsen. Konkret ist die HAWK in Göttingen, die TiHo in Hannover und die BG Borchardt GBR in Westerode angesiedelt.

### **1.5. Projektlaufzeit und Dauer**

Das Projekt wurde zum 13. Februar 2020 bis zum 30. April 2023 bewilligt. Der Projektbeginn verschob sich aus verwaltungstechnischen Gründen (Personaleinstellung) an der TiHo auf den 01. Juni 2020, an der HAWK auf den 01. Mai 2020. Bedingt durch Verzögerungen im Projektablauf aufgrund von Einschränkungen (Einzelbelegung von Laboren und Vorbereitungsräumen, zeitliche Arbeit im Schichtsystem, Krankheitsausfall) während der Covid19-Pandemie wurde am 17. Januar 2023 eine kostenneutrale Verlängerung der Projektlaufzeit bis zum 15. August 2023 genehmigt. Somit betrug die gesamte Projektlaufzeit beim OG-Partner TiHo 37 Monate, beim OG-Partner HAWK 38 Monate.

### **1.6. Budget**

Insgesamt wurden 459.977,99 € als Gesamtausgaben (netto) bewilligt, die alle aus zuwendungsfähige Ausgaben gemäß Ausgabenplan gewährt wurden. Für das OG-Mitglied 2 wurden insgesamt 184.996,88 € vorgesehen, wobei 122.550,00 € auf Personalkosten, 55.566,88 für wissenschaftliche Untersuchungen/Sachmittel und 6.880,00 € auf Reisekosten entfallen, für das OG-Mitglied 1 wurden insgesamt 184.102,76 € bewilligt, wobei 101.523,00 € auf Personalkosten, 55.566,88 für wissenschaftliche Untersuchungen/Sachmittel,

22.397,76€ auf den Kauf von Ausrüstungsgegenständen und 5.182,00 € auf Reisekosten entfallen, für die Projektkoordination wurden insgesamt 49.140,35€ vorgesehen, wobei 21.249,00 € auf Personalkosten, 21.500,00€ für Öffentlichkeitsarbeit und 3.204,00 € auf Reisekosten entfallen (Verwaltungspauschale 3.187,35€). Aufgrund der Reisebeschränkungen während der Covid19-Pandemie wurden Projekttreffen in Präsenz und Multiplikatorveranstaltungen weitestgehend unmöglich, sodass die vorgesehenen Finanzmittel für die Öffentlichkeitsarbeit und Reisekosten nicht oder kaum abgerufen wurden. Bedingt durch den Verzicht auf die Einreichung des Tierversuchsantrages und der in Folge nicht durchgeführten Versuche im Rinder-Stall führte dies zur Nichtinanspruchnahme der bereitgestellten Finanzmittel durch die Borchardt GBR (41.738,00€). In Zusammenhang mit der Anpassung der APs A4, B3 und B4 und der alternativen Themenbehandlung zur Verträglichkeit des Tb-PAWs ohne Tierversuch und Durchführungen im landwirtschaftlichen Betrieb hat sich am Ende ein tatsächlicher Mittelbedarf in Höhe von 330.579,45€ ergeben. Im Detail sind hier 259.814,95€ für Personalkosten, 18.727,00€ für Investitionen, 47.478,17€ für wissenschaftliche Untersuchungen und 885,04€ für Reisekosten entstanden.

## **1.7. Ablauf des Verfahrens**

**Die OG HAWK** begann ihre Projektarbeit im Juni 2020. Innerhalb der ersten Projektphase erfolgte eine Auswahl und Bewertung (und ggf. Modifikation) unterschiedlicher Plasmaquellen hinsichtlich ihrer Eignung zur Herstellung von PAW (AP1). Wobei als Leitwerte zur Produktionseffizienz  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bei verschiedenen Betriebsparametern herangezogen wurden. Die mikrobizide Wirksamkeit der Gerätekonzepte wurde in Zusammenarbeit mit der TiHo untersucht. Aufgrund der genannten Kriterien konnte ein Konzept (im Folgenden Elektrodenarray (EA) betitelt) als wirksamste Quelle zur Produktion von PAW identifiziert werden. Im weiteren Projektverlauf wurden optimierte Betriebsparameter zur wirksamen Abtötung DD-relevanter Mikroorganismen bestimmt (AP2) um eine größtmögliche antimikrobielle Wirksamkeit des Tb-PAWs zu erzielen. Die Optimierung des Anlagenkonzeptes und die folgende Parametrisierung erfolgte unter Verwendung computergestützter Konstruktionsverfahren und reflektometrischer und spektrometrischer Methoden. Anschließend wurde die identifizierten Betriebsparameter zur PAW-Erzeugung des Elektrodenarrays auf 5 DD-relevante Mikroorganismen (siehe unten) angewendet. Darauf folgte die Entwicklung und Konstruktion einer skalierten Anlage zur PAW-Herstellung (AP3), wobei praxis- und sicherheitsrelevante Aspekte im Einsatz unter Realbedingungen im Rinderstall berücksichtigt wurden. Infolge des Änderungsantrages wurden im AP4 hauptsächliche begleitende Modifikationen und eine elektrotechnische, konstruktive sowie mikrobiologische Charakterisierung der skalierten PAW-Anlage durchgeführt.

Während der gesamten Projektlaufzeit wurde das OG-Mitglied TiHo fortlaufend mit (Tb)PAW zur Realisierung der mikrobiologischen Versuchsreihen beliefert.

**Die OG TiHo** startete ihre Projektarbeit im Juni 2020. Innerhalb der ersten Projektphase wurden verschiedene Tb-PAW-Geräte und Geräteeinstellungen untersucht, um eine hohe

antimikrobielle Wirksamkeit des Tb-PAWs zu erzielen. Das „finale“ Tb-PAW des sogenannten Elektroden-Arrays (EA) wurde im Rahmen des AP B1 auf alle fünf ausgewählten Mikroorganismen (*Escherichia (E.) coli*, *Staphylococcus (S.) aureus*, *Clostridium (C.) sporogenes*, *Fusobacterium (F.) necrophorum* und *Porphyromonas (P.) levii*) angewendet und unter verschiedenen Einflussfaktoren wie Lagerzeit, Temperatur und Proteinzusatz getestet. Im darauffolgenden Projektabschnitt, dem AP B2, wurde die antimikrobielle Wirkung des Tb-PAWs auf Häuten verschiedener Tierspezies untersucht. Nach Genehmigung des Änderungsantrags vom 24. März 2022 konnten Versuche, aufgrund der komplexen Matrix der Rinderhaut, auf der Haut der Spezies Schwein und Geflügel (Hähnchen, Ente) an der TiHo als vorbereitende Zwischenschritte durchgeführt werden.

Infolge der Ergebnisse wurde entschieden, nicht direkt die APs B3 (Verträglichkeit des PASs an gesunden Rindern) und B4 (Anwendungsversuch im landwirtschaftlichen Betrieb) durchzuführen, da die Genehmigung eines Tierversuches mit den vorliegenden Erkenntnissen noch nicht als aussichtsreich zu beurteilen war. Alternativ wurden in AP B3 und B4 die Auswirkungen des Tb-PAWs auf die Mikroorganismen direkt, bzw. auf humane Keratinozyten getestet. Hierzu wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Bakterien nach Tb-PAW-Behandlung erstellt und Daten bezüglich der Toxizität des Tb-PAWs in Zellkultur erhoben.

Parallel zu den Versuchen in den Laboratorien fanden regelmäßige Gespräche und Beratungstreffen beim OG-Mitglied BG Borchardt GBR statt. Hierbei waren die Klinik für Rinder und das LMQS involviert und es bestand ein Austausch mit den mit der Klauenpflege am Betrieb befassten Dienstleister. Es wurde eine Bestandsbesichtigung und DD- Untersuchung von der TiHo durchgeführt mit anschließender Berichterstellung und einem Empfehlungsschreiben mit Therapieansätze für Herrn Borchardt.

In einem Abschlussgespräch wurden die umgesetzten Empfehlungen besprochen und diskutiert sowie ein abschließendes Empfehlungsschreiben für den Landwirt angefertigt.

**OG-Plawakiri:** Die Ergebnisse des Innovationsprojektes wurden in einschlägigen internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht (siehe Anhang), sowie auf nationalen Tagungen präsentiert (s. 2.8. Kommunikations- und Disseminationskonzept).

## **1.8. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die DD der Rinder ist eine wichtige infektiöse Klauenerkrankung, die vor allem durch Infektionen mit Bakterien wie *F. necrophorum* oder *P. levii* verursacht wird. Die Therapie dieser Erkrankung besteht meist aus einer Kombination von funktioneller Klauenpflege und Gabe systemischer oder topischer Antibiotika sowie verschiedener Chemikalien. Die systemische Anwendung von Antibiotika führt jedoch zu einer vorübergehenden Unterbrechung der Milch- und Fleischproduktion, wohingegen bei den meisten Chemikalien eine mangelnde Umweltverträglichkeit vorliegt. Im Rahmen des EIP Agri geförderten Projektes „PlaWaKiRi - Der Einsatz von Plasmawasser gegen Klaueninfektionen beim Rind“ wurde in antimikrobiellen Reduktionsstudien der Einsatz eines TRIS-gepufferten Plasma-aktivierten Wassers (Tb-PAW) als alternativer Therapieansatz getestet. Dabei konnte eine

hohe antimikrobielle Wirkung des Tb-PAWs gegenüber verschiedenen für *DD* relevante Mikroorganismen auch unter Einfluss verschiedener Faktoren (Lagerungszeit und Lagerungstemperatur, organisches Material) gezeigt werden. Darüber hinaus wurde die Wirkung des Tb-PAWs auf verschiedenen Tierhäuten mit steigendem Verschmutzungsgrad (Hähnchen, Ente, Schwein und Rind) erprobt. Es konnten bei allen Tierarten in unterschiedlich ausgeprägter Höhe Reduktionen der pathogenen Keime nach Tb-PAW-Behandlung festgestellt werden. In einem zusätzlichen Versuch zur Bestimmung der Toxizität des Tb-PAWs auf humane Keratinozyten zeigte das Tb-PAW, anhand der untersuchten Entzündungsparameter, unter Vorbehalt weitere notwendiger Versuche kein toxisches Potential. Das Tb-PAW bietet dementsprechend vielversprechende Voraussetzungen pathogene Erreger unter verschiedenen Einflussfaktoren zu minimieren. Es konnte eine Anlage zur Herstellung von PAW konstruiert und parametrisiert werden, welche eine Produktionskapazität von ca. 30-40 l/d aufweist (wobei das Gesamtvolumen des PAW durch weitere verfahrenstechnische Anpassungen zumindest verdoppelt werden könnte). Mit dieser Kapazität könnten theoretisch 10 *DD*-befallene Rinder pro Tag behandelt werden. Somit könnte das Tb-PAW eine potenzielle *DD*-Therapie bei Milchkühen darstellen und einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Tiergesundheit in der Rinderhaltung leisten. Aufgrund einer hohen Zeitstabilität (12 h), selbst bei erhöhten Temperaturen von bis zu 30 °C, scheint Tb-PAW ein vielversprechendes Mittel zu sein, das unter realen Bedingungen in landwirtschaftlichen Betrieben eingesetzt werden kann, z. B. als Klauenbad oder Sprühlösung.

*DD* of cattle is an important infectious hoof disease caused mainly by infections with bacteria such as *F. necrophorum* or *P. leyii*. Therapy for this disease usually consists of a combination of functional hoof care and administration of systemic or topical antibiotics and various chemicals. However, the systemic use of antibiotics results in temporary interruption of milk and meat production, whereas most chemicals lack environmental compatibility. As part of the EIP Agri funded project "PlaWaKiRi - The use of plasma water against claw infections in cattle", antimicrobial reduction studies tested the use of a TRIS buffered plasma activated water (Tb-PAW) as an alternative therapeutic approach. Thereby, a high antimicrobial effect of the Tb-PAW against different microorganisms relevant for *DD* could be shown even under the influence of different factors (storage time and storage temperature, organic material). Furthermore, the effect of Tb-PAW was tested on different animal skins with increasing degree of contamination (chicken, duck, pig and cattle). Reductions of pathogenic germs could be induced in all animal species at different levels after Tb-PAW treatment. In an additional test to determine the toxicity of Tb-PAW to human keratinocytes, Tb-PAW did not show any toxic potential on the basis of the inflammatory parameters investigated, subject to further necessary tests. A plant for the production of PAW could be designed and parameterized, which has a production capacity of approx. 30-40 l/d (whereby the total volume of PAW could be at least doubled by further process engineering adjustments). This capacity could theoretically treat 10 *DD*-infested cattle per day.

Accordingly, Tb-PAW offers promising prerequisites for minimizing pathogenic agents under various influencing factors. Thus, Tb-PAW could represent a potential *DD* therapy in dairy cows and make a significant contribution to improving animal health in cattle farming. Due to a high time stability (12 h), even at elevated temperatures of up to 30 °C, Tb-PAW seems to be a promising agent to be used under real farm conditions, e.g. as a hoof bath or spray solution.

## **2. Eingehende Darstellung**

### **2.1. Verwendung der Zuwendung**

#### **2.1.1. Gegenüberstellung Geschäftsplan und tatsächlich durchgeführte Teilschritte**

Der in Abbildung 1 dargestellte Balkenplan gibt einen Überblick über die im Geschäftsplan vorgesehenen Arbeitspakete (AP) des Projektes und den zeitlichen Rahmen. Für eine detaillierte Durchführung der einzelnen Teilschritte innerhalb der Arbeitspakete wurden folgende Projektphasen und Meilensteine festgelegt:

#### **HAWK**

Meilenstein 1:

1. Identifizierung/Anpassung Plasmageräte
2. Ermittlung Parametersätze
3. Modifikation PAW

Meilenstein 2:

1. Erste Abschätzungen zur Entwicklung der skalierten Versuchsanlage

Meilenstein 3:

1. Bevorzugtes Quellenkonzept identifiziert
2. Skalierbarkeit evaluiert

Meilenstein 4:

1. Upscaling der Versuchs-Anlage
2. Strategieänderung nach Änderungsantrag vom 24. März 2022: Beginn elektrotechnische/plasmadiagnostische Charakterisierung der Anlage

Meilenstein 5:

1. Ursprünglich: Installation einer funktionsfähigen Anlage im Stall ist abgeschlossen
2. Strategieänderung nach Änderungsantrag vom 24. März 2022: Beginn elektrotechnische/plasmadiagnostische/mikrobiologische Charakterisierung der Anlage

Meilenstein 6:

1. Veröffentlichung von Versuchsergebnissen
2. Entwicklung der Anlage ist abgeschlossen

## TiHo

### AP B1; Meilenstein 1:

4. Auswahl von Mikroorganismen
5. Protokolle zur Herstellung von Reinkulturen von *DD*- Erregern
6. Änderung der Temperatur und Erhöhung der Lagerzeit des Tb-PAWs

### AP B2; Meilenstein 2:

3. Versuche zur Keimreduktion durch Zusatz von Tb-PAW zu den zu untersuchenden Bakterienkulturen
4. Beginn der Übertragung auf Rinderklauenhaut
5. Evaluation von Rückgewinnungsmethoden
6. ggf. Strategieänderung bei ausbleibendem Erfolg und Geräteanpassung durch HAWK
  - a. 2 Gerätetypen: Elektroden-Array (EA) und TJ
  - b. Strategieänderung nach Änderungsantrag vom 24. März 2022: Versuche mit unterschiedlichen Hauttypen von anderen Haustieren, Berücksichtigung der Komplexität der Haut (Hähnchen, Ente, Schwein, Rind)

### AP B2; Meilenstein 3:

1. Weiterführung der Versuche zur Keimreduktion und Untersuchungen zur Keimreduktion von auf Rinderklauenhaut übertragener Reinkulturen durch Tb-PAW

### AP B3; Meilenstein 4:

1. Laut ursprünglichem Antrag:
  - a. Abschluss Arbeiten auf Rinderklauenhaut - Ergebnisse aus AP B1 & B2 bei min. einem Keim erfolgreich, um eine Umsetzung im Hinblick auf den Tierversuch bei genehmigtem Tierversuchsantrag zu rechtfertigen
  - b. Verträglichkeitsprüfung bei direktem Hautkontakt von Plasmawasser und Rinderklauenhaut (Tierversuch). Die Ergebnisse aus B3 müssen bezüglich der Gewebeerträglichkeit und der Tierschutzkonformität akzeptabel sein, um die Voraussetzungen im Hinblick auf die weitere Genehmigung des Tierversuchsantrages zu erfüllen. Gegebenenfalls Strategieänderung bei ausbleibendem Erfolg
2. Strategieänderung nach Änderungsantrag vom 24. März 2022: Umstrukturierung auf in vitro Tests
  - a. NEU: AP B3 - Verträglichkeitsprüfung (Hautkontakt)
    - i. Viabilitätstest (MTT- Test)
    - ii. Entzündungsparameter und Wachstumsfaktoren mittels PCR/ ELISA

### AP B4; Meilenstein 5:

1. Laut ursprünglichem Antrag:
  - a. Einsatz eines Plasmaklauenbades im Partnerbetrieb, Gruppierung und Scoring der verfügbaren Tiere (Tierversuch). Erfolgreiche Durchläufe unter

Stallbedingungen am Tier zur Reduzierung des epidemischen Drucks und der Anhebung des Tierwohls sowie der Produktionsleistung.

2. Strategieänderung nach Änderungsantrag vom 24. März 2022:
  - a. NEU: AP B4 - Mikroskopische Untersuchung der Mikroorganismen zur Evaluation der Wirkung der Plasmawasserbehandlung
  - b. Fluoreszenzfärbung (Lebend-Tod-Färbung)

Abbildung 1: Balkenplan zum Projektantrag

Arbeitspaket	Jahr	2020	2021												2022												2023									
	Monat	...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3							
	Nr.	...	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34							
A1	...		HAWK																																	
A2			HAWK																																	
A3			HAWK																																	
A4														HAWK																						
B1	...		TiHo																																	
B2			TiHo																																	
B3														TiHo																						
B4																											TiHo									
C1			Landwirt																																	
C2														Landwirt																						
D			HAWK, TiHo, Landwirt																																	

Nach Genehmigung des Änderungsantrags vom 24. März 2022 wurde die Projektlaufzeit bis zum 30. Juni 2023 verlängert und die laufenden Arbeitspakete bis zum Abschluss des Projektes fortgeführt.

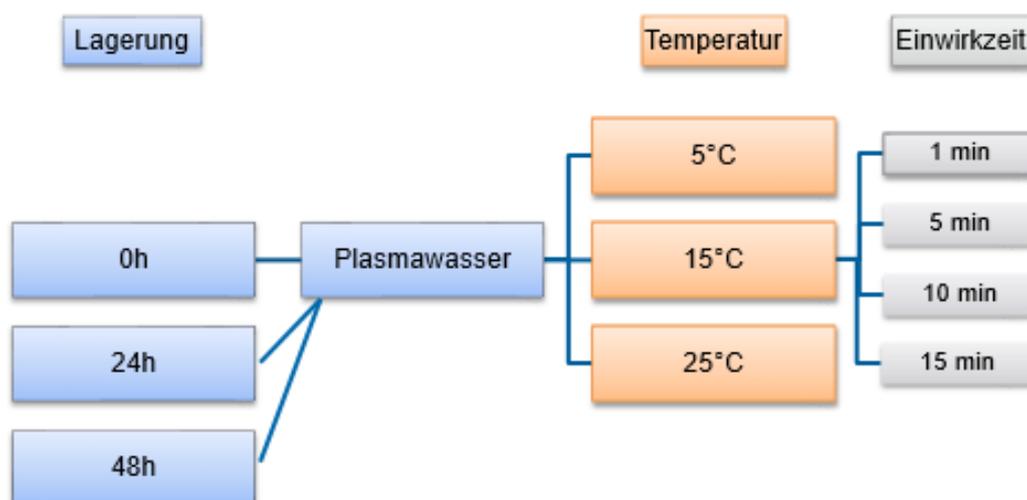
### 2.1.1.1. Arbeitspaket B1 „Auswahl der Mikroorganismen und Versuche mit Reinkulturen“

#### 2.1.1.1.1. „Auswahl der Mikroorganismen und Protokollerstellung zur Herstellung von Reinkulturen“

Nach Einstellung der Mitarbeiterin Frau Große-Peclum zum 01. Juni 2020 wurde mit der Vorversuchsphase des Projektes „PlaWaKiRi“ begonnen. Diese umfasste die Auswahl der Mikroorganismen für die nachfolgenden Anzuchtversuche in Reinkultur. Nach intensiven Gesprächen und Erfahrungsaustausch mit dem Fachpersonal der DSMZ (Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) bezüglich der Anzucht der *DD*-assoziierten Erreger *F. necrophorum* und *P. levii* konnte im August 2020 mit den Anzuchtversuchen dieser Mikroorganismen begonnen werden. Darüber hinaus wurden die im Institut bereits etablierten Anzuchtprotokolle für die Bakterien *E. coli*, *S. aureus* und *C. sporogenes* angewendet. Die Arbeiten zum Erreichen des ersten Meilensteins „Auswahl von Mikroorganismen und Protokolle zur Herstellung von Reinkulturen von Mortellaro- Erregern“ konnten somit abgeschlossen werden.

#### 2.1.1.1.2. „Plasmawasserversuche mit Reinkulturen“

Die erste Version eines Plasmawassergerätes wurde am 21. September 2020 von der HAWK an das LMQS der TiHo gebracht und dort fachgerecht installiert. Anschließend konnte mit der Herstellung der ersten Plasmawässer in unmittelbarer zeitlicher Nähe zu den Laborversuchen mit den Mikroorganismen begonnen werden. In Abbildung 2 sind die im Projektantrag geplanten Einwirkzeit-, Temperatur-, Lagerungs- Kombinationen dargestellt.



**Abbildung 2:** Darstellung der Einwirkzeit-, Temperatur-, Lagerungs- Kombinationen für ein Plasmawasser.

Es wurden mehrere Plasmawässer (verschiedene Geräte) in unterschiedlichen Kombinationen untersucht, wobei die Wirkung im Regelfall zunächst an einer Bakterienspezies (*E. coli*) mit einer Einwirkzeit von 15 min getestet wurde. Die erfolgversprechendsten Ergebnisse wurden hierbei mit dem EA erzielt, sodass alle nachfolgenden Versuche mit diesem Gerät

durchgeführt wurden. Anschließend wurde an einer Erhöhung der Keimreduktion gearbeitet, indem der pH-Wert des Tb-PAWs angepasst und eine optimale Laufzeit bestimmt wurde. Aus den Versuchen ergab sich, dass eine Laufzeit von 20 min bei Verwendung eines 0,5 molarigen TRIS-Puffers (TRIS(hydroxymethyl)aminomethan) mit pH 7,5 die besten Ergebnisse bezüglich der Keimreduktion von *E. coli* ergab. Im Anschluss wurden die Einwirkzeiten des Tb-PAWs reduziert und für die folgenden Versuche eine einminütige Einwirkzeit festgelegt. Bei dieser Einwirkzeit konnte unter Laborbedingungen eine gute Reduktion der *E. coli*-Konzentrationen nachgewiesen werden, was in Hinblick auf eine spätere Anwendung am Tier (kurzes Eintauchen der Klauen im Klauenbad, möglichst kurze Applikationszeit der Flüssigkeit bei unruhigen Tieren) wichtig war.

Aufgrund eines technischen Ausfalls und einer damit einhergegangenen Reparatur des EAs wurde in der Zeit vom 23. Februar 2021 bis zum 22. Mai 2021 in Kooperation zwischen der HAWK und der TiHo mit Erfolg daran gearbeitet den Ursprungszustand mit vergleichbarer Wirksamkeit des Tb-PAWs wiederherzustellen. Anschließend folgten Untersuchungen der Wirksamkeit des Tb-PAWs auf die für das Projekt vorgesehenen Bakterienkulturen *E. coli*, *S. aureus*, *C. sporogenes*, *F. necrophorum* und *P. levii*. Aufgrund der erfolgreichen Reduktion von *E. coli*, sowie der beiden DD-assoziierten Keime *F. necrophorum* und *P. levii* konnte ein wichtiger Teilschritt im AP B1 erfolgreich abgeschlossen werden.

Im weiteren Verlauf des AP B1 wurde der Fokus auf den Arbeitsschritt „Anwendung eines artifiziell zugesetzten Störfaktors“ gelegt, um ein zügigeres Voranschreiten des AP B2 zu erreichen. Als Störfaktor wurde „Bovines Serum Albumin“ (BSA) ausgewählt, um eine mögliche Interaktion von Proteinen und dem Tb-PAW und einer damit einhergehenden Verringerung der Tb-PAW-Wirkung zu verifizieren. Dies war im Hinblick auf die geplante Anwendung des Tb-PAWs auf Tierhaut von großer Bedeutung, da deren Oberfläche viele Proteine als potentielle „Störfaktoren“ enthält. Zur Umsetzung dieser Versuchsreihe wurde sowohl 5%ige, als auch 10%ige BSA-Lösung hergestellt. Das BSA wurde für 1 min mit *E. coli* und Tb-PAW vermischt und im Anschluss die Reduktionseigenschaften des Tb-PAWs ermittelt. Nachdem die Reduktion bei beiden BSA-Konzentrationen mit den ohne Proteinzusatz behandelten Proben vergleichbar war, wurden auch *F. necrophorum* und *P. levii* auf diese Weise untersucht. Diese Auswahl wurde anhand der Ergebnisse der in vitro- Versuche mit guter Keimreduktion nach einer einminütigen Einwirkzeit getroffen. Aufgrund der mit den Proben ohne Proteinzusatz vergleichbaren Reduktion von *E. coli*, *F. necrophorum* und *P. levii* konnte ein weiterer wichtiger Teilschritt im AP B1 erfolgreich abgeschlossen werden.

Die Versuchsreihe „Einfluss der Lagerzeit und Temperatur auf die keimreduzierenden Eigenschaften des Tb-PAWs“ wurde ab dem 01. Januar 2022 begonnen. Für die Versuche wurde das Tb-PAW bei drei verschiedenen Temperaturen (7 °C, 21 °C und 30 °C) gelagert und die bakterizide Wirkung gegen *E. coli* zu vier Zeitpunkten (4 h, 8 h, 12 h und 24 h) bewertet. Bei allen Temperaturen und Lagerungszeiten traten zwischen der unbehandelten TRIS-Puffer-Kontrolle und den entsprechenden Tb-PAW-Proben signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Reduktionen von *E.*

*coli* auf. Allerdings zeigte die Tb-PAW-Probe, gelagert bei 30 °C für 24 h, signifikant höhere Restkeimgehalte im Vergleich zu den anderen drei Zeitpunkten. Zudem fiel bei dieser Lagerungs-Temperaturkombination ein signifikant höherer Keimgehalt im Vergleich zu den bei 7 °C und 21 °C für 24 h gelagerten Proben auf. Nach Beendigung dieser Versuchsreihe konnte das AP B1 vollständig beendet werden.

#### 2.1.1.2. Arbeitspaket B2 „Versuche mit Rinderklauenhaut mit Zwischenschritten auf Tierhäuten der Spezies Schwein und Geflügel“

Aufgrund von Verzögerungen bei der Produktion eines geeigneten Plasmawassers im AP B1 wurde mit den Versuchen zum AP B2 „Übertragung optimaler Plasmaparameter aus Reinkulturversuchen auf Rinderklauenhaut“ bereits früher als in der ursprünglichen Projektplanung vorgesehen begonnen. Das AP beinhaltet die Präparation von Rinderklauenhaut an geschlachteten Tieren ohne DD- Erkrankung. Hierfür wurde die Haut der Rinderbeine so zurechtgeschnitten, dass isolierte einheitliche Hautstanzen entstanden. Diese Hautstücke sind im Anschluss einem Dekontaminationsverfahren unterzogen worden, bevor die verbliebene Gesamtkeimzahl überprüft und die Hautstücke mit den in AP B1 ausgewählten Bakterienpezies inokuliert wurden. Im späteren Projektverlauf wurden die Bakterien auf der inokulierten Haut dem Einfluss von Plasmawasser ausgesetzt und so die keimreduzierende Wirkung auf der Matrix Haut überprüft. Dies umfasste auch die Etablierung einer Methode zur Rückgewinnung der aufgebrauchten Mikroorganismen.

Nach ausführlicher Recherche über geläufige Hautdesinfektionsmethoden wurde eine Lösung aus 75% Isopropanol und 0,126% Wasserstoffperoxid unter Berücksichtigung der von der World Health Organization (WHO) herausgegebenen Herstellungsvariante eines Desinfektionsmittels auf die Rinderhaut appliziert. Hierzu wurde nach vorheriger Schur und Waschung der präparierten Hautstücke die Dekontamination mit der obengenannten Lösung mit verschiedenen Einwirkzeiten durchgeführt und anschließend die aerobe und anaerobe Gesamtkeimzahl, sowie die Keimzahlen von *S. aureus* und *E. coli* bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass selbst eine Anwendung des Desinfektionsmittels über eine verlängerte Einwirkzeit kaum Reduktionen der originären Keimflora der Rinderhaut zur Folge hatte.

Daraus abgeleitet ergab sich eine Ausweitung der Versuchsreihe auf Tb-PAW-Versuche an der Haut anderer Schlachtspezies (Schwein, Hähnchen), da diese bereits während der Schlachtung keimreduzierenden Prozessen (z.B. Brühen, Abflammen) unterzogen werden und somit erwartungsgemäß eine weniger komplexe Matrix darstellten.

Im Zusammenhang mit diesen Dekontaminationsversuchen sind erste Versuche zur Auswahl einer geeigneten Methode für die Gewinnung der Bakterien von der Klauenhaut ausgetestet worden. Dabei wurde grundsätzlich das Tupfverfahren in Anlehnung an die DIN 10113-1 „Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich“ verwendet und variiert.

Nach Genehmigung des Änderungsantrags vom 24. März 2022 konnten Versuche auf der Haut der Spezies Schwein und Geflügel (Hähnchen, Ente) an der TiHo als vorbereitende Zwischenschritte durchgeführt werden. Aufgrund des Ausfalls der Plasmaquelle EA wurde für diese Versuche das Tb-PAWs der Plasmaquelle des Großgerätes (TJ) eingesetzt.

Hierzu wurden mit *E. coli* und *C. jejuni* inokulierte Brustfilets und Schenkel von Hähnchen und Enten mit Tb-PAW behandelt, im Anschluss unter einer modifizierten Schutzgasatmosphäre (30% CO<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>) verpackt und für 14 Tage bei 4 °C gelagert. Bei den Hähnchen-Proben konnte an Tag 7 und 14 der Lagerung eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Reduktion von *C. jejuni* gegenüber den Kontrollen direkt nach der Behandlung und Verpackung erreicht werden. Dabei wurde die Reduktion am 7. Tag im Vergleich zur TRIS-Puffer-Kontrolle beobachtet, während die Reduktion an Tag 14 zwischen Tb-PAW und der unbehandelten Gruppe auftrat. Allerdings wiesen *E. coli* und die originären Keimflora über die gesamte Lagerzeit keine verbesserte Reduktion nach Tb-PAW-Behandlung auf. Im Gegensatz zur Hähnchenhaut wurde bei der Entenhaut an Tag 14 der Lagerung *E. coli* im Vergleich zu der unbehandelten Probe deutlich reduziert. Bei der originären Keimflora und *C. jejuni* konnte jedoch kein signifikanter Effekt der Tb-PAW-Behandlung festgestellt werden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden vergleichbare Versuche unter Verwendung von Schweinehaut (Schwarte) durchgeführt. Hierbei konnte bei *E. coli* eine signifikante Reduktion am 14. Tag nach der Tb-PAW-Behandlung erzielt werden. Somit konnte ein weiterer Abschnitt des AP B2 erfolgreich abgeschlossen werden. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen dann als Grundlage für die Durchführung der zum Projektende hin folgenden Rinderhautversuche.

Im letzten Berichtszeitraum konnten die noch ausstehenden Rinderhautversuche durchgeführt werden. Es wurden sowohl Versuche zur Simulation einer Sprühbehandlung als auch einer Tauchbehandlung mit Tb-PAW umgesetzt. Aus dem Versuch resultierten signifikante Reduktionen für *E. coli* sowohl für die Sprüh- als auch für die Tauchbehandlung mittels Tb-PAW. Dabei wurden Unterschiede zwischen der TRIS-Kontrolle und den Tb-PAW-Proben gefunden, sowie zwischen den unbehandelten Kontrollen und den Tb-PAW-Proben. Auch eine erneute Behandlung nach 24 h resultierte in signifikanten Reduktionen zwischen den erwähnten Kombinationen. *F. necrophorum* und *P. levii* zeigten keine signifikanten Keimreduktionen durch die jeweiligen Behandlungsverfahren (vorsichtige Interpretation aufgrund insgesamt niedriger Keimzahlen in allen Durchgängen). Diese Ergebnisse liefern interessante Erkenntnisse bezüglich der Wirksamkeit von Tb-PAW auf geschorener Rinderhaut und geben Anlass, die Anwendung von Tb-PAW auf der Haut von Tieren weiter zu verfolgen.

#### 2.1.1.3. Arbeitspaket B3 „Untersuchung von Auswirkungen der Plasmawasserbehandlung in der Zellkultur“

Die Erkenntnisse aus den Versuchen in AP B1 und B2 waren nicht ausreichend geeignet, um das ursprünglich vorgesehene Arbeitspaket zur Testung der Verträglichkeit des Tb-PAWs in der Anwendung am Tier im Tierversuch zu beantragen. Hierfür wären einerseits eindeutiger

Reduktionen auf der Tierhaut (hoher zu erwartender Nutzen gegenüber einer möglichen Belastung der Tiere im Versuch), andererseits aber auch belastbare Erkenntnisse über die Verträglichkeit des Tb-PAWs und die konkrete Wirkweise (mode of action) notwendig geworden. Ersatzweise wurde aus diesem Grund zur weiteren Vorbereitung eines späteren praktischen Einsatzes des Tb-PAWs auf die Anwendung in der Zellkultur ausgewichen. Hierbei wurde das Tb-PAW auf humane Zelllinien (HaCaTs) gegeben und verschiedene Parameter wie die Zellvitalität (mittels Viabilitätstest, MTT- Test) sowie die Entstehung von Entzündungsparametern und Wachstumsfaktoren mittels PCR und ELISA bestimmt. Der MTT-Test konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Die Ergebnisse der PCR- und ELISA-Versuche zeigen, dass deutlich weniger Entzündungsparameter (Zytokine = IL-6, Interleukin 6 und TNF- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) nach Tb-PAW- Anwendung im Vergleich zu den LPS (Lipopolysaccharide)-Kontrollen ausgeschüttet wurden. Die vorliegenden Daten geben daher keinen Hinweis auf einen toxischen Einfluss des Tb-PAW bei Anwendung auf HaCaT-Zellen. In Zukunft sollten darüber hinaus noch weitere Entzündungsparameter untersucht werden. Es ist geplant, weitere Daten über den Abschluss des Projektes hinaus zu erheben und die Ergebnisse zu publizieren.

#### 2.1.1.4. Arbeitspaket B4 „Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Mikroorganismen zur Evaluation der Wirkung der Plasmawasserbehandlung“

In dem Zeitraum vom 01. Juli 2022 bis zum 31. Dezember 2022 konnte die neue Versuchsreihe „Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Mikroorganismen zur Evaluation der Wirkung der Plasmawasserbehandlung“ begonnen und erfolgreich abgeschlossen werden. Diese Versuchsreihe wurde eingeführt um die Wirkung des Tb-PAWs auf *F. necrophorum*, *P. levii*, *E. coli*, *S. aureus* und *C. sporogenes* besser beurteilen zu können und dies mittels Nachweis von zellulärem Stress, morphologischen Veränderungen oder Veränderungen der Membranintegrität. Hierzu wurde das Tb-PAW des Großgerätes (TJ) verwendet. Die Bakterien wurden, wie bereits unter 2.1.1.1.2. „Plasmawasserversuche mit Reinkulturen“ für den EA beschrieben, behandelt und anschließend fluoreszierend angefärbt. Mittels dieser sogenannten Lebend-Tod-Färbung konnte die Anzahl der lebenden (grün), toten (rot), sowie subletal (orange) geschädigten Bakterien dargestellt werden.

#### 2.1.1.5. Beratungstreffen beim OG- Mitglied BG Borchardt GBR

Am 05. Mai 2021 fand eine Betriebsbesichtigung/ -beratung bei dem OG- Mitglied BG Borchardt GBR statt. Hierbei wurde unter anderem über den aktuellen Projektstand, das Management des Betriebes (Fütterung, Hygiene der Tierställe, Gruppierung der Tiere etc.) und den Gesundheitszustand der im Betrieb vorhandenen Milchkühe gesprochen. Außerdem war Ziel des Besuches, den Betrieb für spätere Versuchsabläufe kennen zu lernen, um z.B. die Umsetzung eines Klauenbades zu realisieren oder Möglichkeiten der Tiergruppierung einführen zu können.

Die beratenden Tätigkeiten der TiHo konnten wie folgt ausgeübt werden: In Absprache mit Herrn Borchardt wurde ein regelmäßiges Scoring der Klauenerkrankungen im Tierbestand vom eigenen Klauenpfleger vorgesehen. Die dort gewonnenen Erkenntnisse wurden dann an das LMQS der TiHo weitergeleitet, welches in Absprache mit der Klinik für Rinder entsprechende Projekt-bezogene Empfehlungen ausarbeitete.

Am 12. November 2021 fand eine weitere Betriebsbesichtigung/ -beratung statt. Zusammen mit Mitarbeiterinnen der Klinik für Rinder der TiHo wurde eine ausführliche Besichtigung des Betriebes durchgeführt. An allen Milchkühen sowie Trockenstehern wurden der Body Condition Score (Maß für den Ernährungszustand der Tiere), die Lahmheitsgrade bestimmt und die Tiere auf das Vorhandensein von *DD* untersucht. In Absprache mit Herrn Borchardt wurden die akut erkrankten Tiere noch vor dem nächsten Klauenpflegetermin medizinisch versorgt. Es wurde ein ausführlicher Bericht von den MitarbeiterInnen der Klinik für Rinder über den aktuellen Stand im Betrieb erstellt. Dieser wurde mit dem LMQS abgesprochen und an Herrn Borchardt übermittelt. Zusätzlich wurden Herrn Borchardt die im Protokoll vorhandenen Therapieansätze dargelegt. Das Protokoll umfasste eine Status-quo-Erhebung des aktuellen Betriebsmanagements (Fütterung, Hygiene der Tierställe, Gruppierung der Tiere etc.) sowie den Gesundheitszustand der im Betrieb vorhandenen Milchkühe, unter anderem der Body Condition Score (Maß für den Ernährungszustand der Tiere) und die Lahmheitsgrade. Auf dieser Grundlage wurden entsprechende Empfehlungen gegeben, konkret alle akut erkrankten Tiere (Läsion im M2-Stadium) zu behandeln, regelmäßig Klauenbäder mit registriertem Biozid nach Herstellerangaben durchzuführen, die Tiere zum Trockenstellen einer Klauenpflege und nötigenfalls einer *DD*-Behandlung zu unterziehen, den Schieber häufiger laufenzulassen, die Quergänge mehrmals täglich abzuschieben und Futtermenge zu erhöhen.

Am 20. und 21. Dezember 2022 wurde eine weitere Klauenpflege mit ausführlicher Dokumentation der Klauenerkrankungen durch die Klauenpfleger durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dem LMQS übermittelt, mit der Klinik für Rinder besprochen und mit den vorherigen Berichten verglichen.

Zum Ende des Projektes fand ein Abschlussgespräch zwischen Herrn Borchardt, der Klinik für Rinder und dem LMQS statt, bei welchem die umgesetzten Empfehlungen besprochen, diskutiert sowie ein Abschlussbericht angefertigt wurde. Herr Borchardt konnte die vorgegebenen Maßnahmen zum Teil umsetzen und zudem über das Projekt einen Spaltenschieber-Roboter für mehrere Monate austesten. Aufgrund der guten Praktikabilität hat er diesen im Anschluss für seinen Betrieb erworben.

## **2.1.2. Darstellung der wichtigsten finanziellen Positionen**

Ausgaben für Personalkosten:

Die Personalausgaben der Tierärztlichen Hochschule Hannover umfassen die Beschäftigung der Tierärztin Frau Vanessa Große-Peclum im Zeitraum vom 01. Juni 2020 bis zum 30. Juni 2023 nach TV-L E 14/1 mit 50%. Die Personalausgaben der HAWK Fakultät I umfassen die Beschäftigung von Herrn Georg Avramidis im Zeitraum vom 01. Mai 2020 bis 31. Juli 2023 nach TV-L E 13 mit 8%, die Beschäftigung von Herrn Tom Götting als studentische Hilfskraft nach Einheitskostensatz vom 01. April 23 bis 30. Juni 23, die Beschäftigung von Frau Ingrid Curril im Zeitraum vom 01. Februar 2023 bis 30. Mai 2022 nach TV-L E 13 mit 50% und im Juni 2023 nach TV-L E 13 mit 90%, die Beschäftigung von Herrn Christian Ochs im Zeitraum vom 01. August 2020 bis 31. Mai 2023 nach TV-L E 13 mit 50% und die Beschäftigung von Herrn Marcus Harms im Zeitraum vom 01. August 2020 bis 31. Juli 2021 nach TV-L E 13 mit 50%.

Ausgaben für Investitionsmittel:

Tantec Netzgerät HV-X20: 18.727,00€

## **2.2. Detaillierte Erläuterung der Situation zu Projektbeginn**

### **2.2.1. Ausgangssituation**

Die *DD* führt aufgrund von schmerzhaften Läsionen häufig zu Lahmheit bei Rindern. Diese Läsionen sind durch erosive Ulzerationen gekennzeichnet, die oft als feuchte, kreisförmige, erdbeerartige Strukturen mit langen Haaren erscheinen. Das verminderte Wohlergehen der Rinder spiegelt sich in einer geringeren Milchleistung, niedrigeren Körperkonditionswerten, schlechteren Reproduktionsleistungen und erhöhten Verlusten durch frühzeitige Keulung wider. Die auslösenden Faktoren sind vielfältig. Dazu gehören z.B. unhygienische Stallbedingungen, Spaltenböden ohne Abstreifer, das Stehen in nassem Mist sowie das Eindringen von Krankheitserregern wie *F. necrophorum*, *P. levii* oder *E. coli*. Seit Jahren stellt die Behandlung der *DD* eine große Herausforderung dar. Nach wie vor wird an Behandlungsalternativen zu den derzeit häufig verwendeten systemischen oder topischen Antibiotikaanwendungen geforscht. Oxytetracyclin oder Lincomycin werden häufig als topische Therapie eingesetzt, während Erythromycin häufig für Gruppenbehandlungen mit Fußbädern verwendet wird. Leider verursacht der Einsatz von Antibiotika wirtschaftliche Verluste für die Landwirte, da die Milch- und Fleischproduktion vorübergehend unterbrochen wird. Heutzutage wird insbesondere PAW in vielfältiger Weise eingesetzt, z. B. in der Mikrobiologie zur Bakterienreduktion oder in der Medizin zur Wundheilung, Behandlung von Hautkrankheiten oder zur Krebstherapie. Die in der einschlägigen Literatur gezeigten mikrobizide Wirkungen von PAWs sind vielversprechend. Es ist notwendig die mikrobizide Aktivität von PAWs im Hinblick auf die Anwendbarkeit in einer landwirtschaftlichen Einrichtung zu bewerten, um pathogene Mikroorganismen unter verschiedenen Bedingungen zu reduzieren und somit eine alternative Therapie oder Prophylaxe für das Management von *DD* im Stall zu bieten.

### **2.2.2. Projektaufgabenstellung**

Durch die Kooperation der HAWK, der TiHo und dem landwirtschaftlichen Betrieb BG Borchardt GBR sollen folgende Aufgaben interaktiv gelöst werden:

1. Bereitstellung einer geeigneten Plasmaquelle zur Produktion von Tb-PAW und Bereitstellung von Tb-PAW für die Untersuchungen an der TiHo.
2. Keimreduktion durch Zusatz von Tb-PAW zu verschiedenen Bakterienkulturen mittels PAW-Herstellung von 2 Gerätetypen (Elektroden-Array und TJ)
3. Identifizierung eines geeigneten Parametersatzes zur Herstellung von Tb-PAW
4. Übertragung der Versuche auf Rinderklauenhaut mit Erweiterung um weitere Tierspeziesunter Berücksichtigung der Komplexität der Haut (Hähnchen, Ente, Schwein, Rind)
5. Ursprüngliche Verträglichkeitsprüfung bei direktem Hautkontakt von Plasmawasser und Rinderklauenhaut (Tierversuch). Nach Änderungsantrag vom 24. März 2022

Verträglichkeitsprüfung (Hautkontakt) mittels Viabilitätstest (MTT- Test) und Messung von Entzündungsparametern bzw. Wachstumsfaktoren mittels PCR/ ELISA in der Zellkultur

6. Ursprünglich Einsatz eines Plasmaklauenbades im Partnerbetrieb, Gruppierung und Scoring der verfügbaren Tiere (Tierversuch). Nach Änderungsantrag vom 24. März 2022 mikroskopische Untersuchung der Mikroorganismen zur Evaluation der Wirkung der Plasmawasserbehandlung mittels Fluoreszenzfärbung (Lebend-Tod-Färbung)
7. Konstruktion Fertigung und Charakterisierung einer Anlage zur Produktion von PAW die unter Real/Stall-Umgebung eingesetzt werden kann.

## **2.3. Ergebnisse der OG in Bezug auf**

### **2.3.1. Wie wurde die Zusammenarbeit im Einzelnen gestaltet?**

Über die gesamte Projektlaufzeit hinweg bestand regelmäßiger Austausch zwischen den Projektpartnern, insbesondere zwischen OG 1 (HAWK) und OG 2 (TiHo). Neben Präsenztreffen zu Projektbeginn wurde aufgrund der Covid19-Pandemie vor allem auf Online-Treffen über MS Teams oder WebEx ausgewichen. Dies stellte für alle Beteiligten eine zeitsparende Alternative mit hoher Flexibilität dar.

Die unmittelbare Abstimmung über Austausch des Tb-PAWs hinsichtlich der Termine, der Lieferzeiten und kurze Rückfragen wurden überwiegend telefonisch oder via E-Mail abgewickelt. Dennoch war es möglich, dass beide OG-Partner gegenseitig Einblicke in die Gegebenheiten der Untersuchungsmöglichkeiten erhalten konnten. Dies war sehr förderlich für den gemeinsamen Austausch und hat die Zusammenarbeit im Projekt interaktiv gestaltet. Auch die Beiträge bei der Innovent, bei denen das Projekt PlaWaKiRi vorgestellt werden durfte, wurden in Absprache zwischen den OG-Partnern geplant. Die Zusammenarbeit mit OG 3, dem landwirtschaftlichen Partner, wurde bereits zu Projektbeginn insbesondere durch den Koordinator, die OG 1, sichergestellt. Zu einer engeren Zusammenarbeit zwischen OG 2 und 3 kam es erst im Hinblick auf das Scoring der Klauenbefunde der Tiere des Betriebes. Hier wurde auch die Klinik für Rinder eingebunden, die entsprechende Expertise eingebracht hat. Die Kommunikation zwischen LMQS und Klinik für Rinder war durch die unmittelbare Nähe der Gebäude auf dem Campus der TiHo sehr eng gewährleistet. Die Zusammenarbeit mit dem landwirtschaftlichen Betrieb kennzeichnete sich vor allem durch die ganztägigen Vor-Ort-Besuche und entsprechenden telefonischen bzw. digitalen Austausch über die Terminabsprachen bzw. die ausgesprochenen Empfehlungen. Insgesamt ist zusammenzufassen, dass das Projekt PlaWaKiRi drei OG-Partner zusammengebracht hat, die auf kurzen Wegen und flexibel miteinander die Fragestellungen bearbeiten konnten und so zu einem guten und fruchtbaren Verlauf des Projektes geführt haben. Wie in 1.1.3. beschrieben, setzt sich die Partnerschaft zwischen OG 1 und 2 bereits in einem weiteren, aktuell laufenden Projekt fort.

### **2.3.2. Was war der besondere Mehrwert bei der Durchführung des Projektes als OG?**

Als Teil einer Organisatorischen Gruppe ist die Austauschmöglichkeit eine wichtige Grundlage für den erfolgreichen Projektablauf. Eine gute Koordination und dichte Absprachen zwischen den OG-Partnern trägt daher insbesondere zum Fortschritt der Arbeiten bei, bietet aber auch Einblicke in andere fachliche Sparten mit entfernterem Themenbezug. Hierdurch können neue Schnittstellen entdeckt und gemeinsame Synergien zur Bearbeitung und Lösung bislang ungeklärter Fragestellungen leichter genutzt werden.

Unabhängig davon kann die Verzahnung der OG-Partner in Abhängigkeit vom vorgesehenen Projektverlauf phasenweise sehr eng, aber auch selbstständig gestaltet sein. Die regelmäßigen festgelegten Termine zu den Arbeitspaketen und Meilensteinen, aber auch die Absprachen und Zielsetzungen zu den Zwischen- und Abschlussberichten führen zu einer stringenten Bearbeitung innerhalb des Projektes.

### **2.3.3. Ist eine weitere Zusammenarbeit der Mitglieder der OG nach Abschluss des geförderten Projektes vorgesehen?**

Aufgrund der effektiven und dichten Zusammenarbeit im Projekt PlaWaKiRi haben sich weitere gemeinsame Forschungsinteressen ergeben. Hierbei sollen weitere Anwendungsmöglichkeiten des Tb-PAWs in Kombination mit anderen Dekontaminationsverfahren auf Schlachttierkörperoberflächen und Fleischteilstücken erprobt werden. Das Projekt wird ebenfalls durch die Europäische Innovationspartnerschaft „Landwirtschaftliche Produktivität und Nachhaltigkeit“ (5. Call) gefördert. Weitere Projektanträge mit fachlichem Themenbezug sind in Vorbereitung.

## **2.4. Ergebnisse des Innovationsprojektes**

### **2.4.1. Zielerreichung**

Die im Projektplan festgelegten Meilensteine konnten innerhalb der Projektlaufzeit erreicht werden. Aufgrund der Ergebnisse der in vitro Versuche in AP B1 und B2 wurde für die TiHo gegenüber dem ursprünglichen Antrag eine Anpassung der APs B3 und B4 vorgeschlagen und am 24. März 2022 genehmigt. Für die HAWK entfiel damit das AP A4. Hierdurch kam es ebenfalls zu einer Angleichung im zeitlichen Ablauf und in den Meilensteinen. Der Arbeitsschritt der Rinderhautversuche benötigte eine umfänglichere Vorerfahrung, die durch die Berücksichtigung der Haut anderer Tierspezies (Geflügel, Schwein) mit weniger komplexen Matrices erreicht werden konnte. Des Weiteren zeigte sich nach AP B1 und B2, dass die Genehmigung der vorgesehenen Tierversuche (B3 und B4) aufgrund der zu geringen Reduktionen bei den in vitro (Haut-)versuchen, noch nicht beantragt werden konnte. Alternativ wurden neue Erkenntnisse im Bereich der Toxizität des Tb-PAWs gewonnen, die die Aussichten einer späteren Anwendung am lebenden Tier verbessern. Das AP A2 der HAWK wurde wie geplant bearbeitet und abgeschlossen, ebenso das AP A3, da das AP A4 der HAWK aufgrund der Nichtgenehmigung des Tierversuchsantrages entfiel, wurde das AP A3 durch

eine vollständige Charakterisierung der Stall-Anlage erweitert und weitgehend abgeschlossen, sodass eine unter Realbedingungen einsetzbare Anlage zur Produktion von (Tb)PAW mit einer Tagesleistung von ca. 50 l entwickelt und gefertigt werden konnte. Im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Versuche konnten weiterhin deutliche Auswirkungen des Tb-PAWs auf die Bakterienzellen gezeigt werden. Aufgrund der umfangreichen Vorarbeiten mit den Häuten der anderen Tierspezies wurden die Arbeiten zur Behandlung der Rinderhaut zum Projektende hin abgeschlossen.

#### **2.4.2. Abweichung zwischen Planung und Ergebnis**

Arbeitspaket A1 und B1 gaben vor, dass im Laufe des Projektes bis zu zwei Plasmawässer von verschiedenen Herstellungskonzepten (Plasmaquellen) zum Einsatz kommen können. Aufgrund fehlender mikrobizider Wirkung des Plasmawassers des ersten eingesetzten Gerätes, wurden weitere Plasmaquellen bzw. Wässer resultierend aus unterschiedlichen Systemeinstellungen ausgetestet. Insgesamt wurden so sechs verschiedene experimentelle Plasmawassergeräte ausgetestet. Nach Identifizierung des für die folgenden Versuche eingesetzten Gerätes wurde dieses parametrisiert um die zukünftig verwendeten Betriebskennwerte zu bestimmen (AP A2).

Es haben Untersuchungen zur Einstellung eines effektiven Plasmawassergerätes im experimentellen Maßstab in enger Zusammenarbeit der HAWK mit der TiHo stattgefunden. Diese nahmen vermehrt Zeit in Anspruch, unter anderem aufgrund notwendiger zu wiederholender mikrobiologischer Untersuchungen. Ebenso mussten regelmäßige, wiederkehrende Evaluationsuntersuchungen zum Upscaling bzw. der Parametrisierung der Großanlage im Vergleich zum experimentellen Plasmawassergerät unter Verwendung des Modellkeims *E. coli* durchgeführt werden. Diese beiden Punkte haben ein schnelleres Voranschreiten bezüglich der Untersuchung der Einflussfaktoren bei ausreichender Anzahl an Wiederholungen verzögert. Jedoch trug dies maßgeblich zu den verbesserten Projektergebnissen hinsichtlich der Keimreduktion bei den verschiedenen Mikroorganismen sowie zu einem robusten Konzept hinsichtlich der Herstellung von PAW bei.

Aufgrund der komplexen Hautbeschaffenheit beim Rind (Haare, verdreckte Klauen mit Kot, Erde und Stroh) und damit einhergehender hoher Grund-Keimbelastung und ebenso aufgrund nicht optimaler Keimreduktionen auf der geschorenen/rasierten Haut nach verschiedenen Desinfektionsmethoden wurden die Untersuchungen und die Methodenentwicklung zunächst auf weniger komplexen Haut-Matrizes von Geflügel (Huhn und Ente) und Schwein durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse und Methoden konnten im Anschluss die Anwendung auf der Rinderhaut erleichtern.

Aufgrund eines technischen Defektes war der EA seit März 2022 nicht mehr einsatzfähig. Nach Absprache zwischen der HAWK und der TiHo wurde im Projekt mit dem Tb-PAW des im Rahmen des Projektes neuentwickelten Konzeptes des TJs gearbeitet. Durch diese Neuentwicklung auf Basis des vorherigen Konzeptes sind höhere Produktionskapazitäten möglich, so dass eine robuste Anlage zur Produktion von PAW unter realen

Einsatzbedingungen zur Verfügung steht. Hierfür wurden die Versuche mit Schwarte neu begonnen, um die wissenschaftliche Vergleichbarkeit dreier Durchgangswiederholungen zu gewährleisten. Die Notwendigkeit der Wiederholung dieser Versuchsreihe führte zu einer zeitlichen Abweichung gegenüber den ursprünglichen Planungen.

Die am 24. März 2022 genehmigten Änderungen in der Ausrichtung des Projektes hinsichtlich der AP B3 und B4 haben zu Anpassungen im zeitlichen und inhaltlichen Ablauf geführt. Aufgrund terminlicher Absprachen bezüglich der Nutzung des Fluoreszenzmikroskops wurde die Versuchsreihe „Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Mikroorganismen zur Evaluation der Wirkung der Plasmawasserbehandlung“ vorgezogen. Zeitgleich wurden die PCR und ELISA Versuche durchgeführt. Die Änderungen führte auch zu einer Neuanpassung des AP A4 bzw. des AP A3 der HAWK, welche man um eine Charakterisierung der Anlage in mikrobiologischer und elektrotechnischer Hinsicht erweiterte. Zum Ende des Projektes konnten alle Arbeiten erfolgreich abgeschlossen werden.

### **2.4.3. Projektverlauf**

#### **2.4.3.1. Arbeitspaket A1 „Auswahl und Modifikation vorhandener Plasmaquellen zur Herstellung von PAW“**

Zu Beginn des Projektes fand eine Auswahl aus vorhandenen Quellenkonzepten zur Herstellung von plasmabehandelten Flüssigkeiten statt. Hierbei wurde zunächst eine Prüfung auf Eignung (insbesondere auf die Skalierbarkeit) eines bestehenden Plasmaquellenkonzeptes für das Projekt durchgeführt. Des Weiteren diente auch ein Kriterienkatalog zur Auswahl, in welchem weitere Kriterien, wie z.B. Stromverbrauch, robuster Betrieb in schwieriger Umgebung, geringe Komplexität zwecks Wartungsarmut, etc. berücksichtigt sind. Insgesamt wurden 6 Plasmaquellen getestet. Aus den gesamten Kriterien und erfolgten Vortests ergab sich zunächst eine Auswahl folgender zwei Plasmaquellen, die einer weiteren Prüfung unterzogen wurden

- Ozongenerator
- Plasmaröhre

Bei dem Ozongenerator wird mittels eingebauter dielektrisch behinderte Elektrode ein Plasma gezündet. Das benötigte Prozessgas, in diesem Fall Umgebungsluft, wird durch einen Kompressor angesaugt, verdichtet und in die Elektrode eingeleitet. Bei der Plasmaentladung entsteht unter anderem Ozon, das für die Plasmawasser (PAL) Herstellung benötigt wird. Am Elektrodenaustritt wird das Ozon durch Silikonschläuche weitergeleitet bis zum Austritt am Gehäuse des Ozongenerators. Der wesentliche Vorteil bei diesem Gerät liegt darin, dass das entstehende Ozon bei Umgebungstemperatur liegt. Bedingt durch die Schlauchführung, ist die Wegstrecke (und damit die Verweildauer des Plasmaeffluentes) zwischen Entstehungsort und Einleitung in die Flüssigkeit (Wasser) vergleichsweise lang.

Die Plasmaröhre ist eine Eigenentwicklung an der HAWK. Das Entladungsprinzip ist analog zu dem des Ozongenerators (dielektrisch behinderte Elektrode). Ein wesentlicher Vorteil

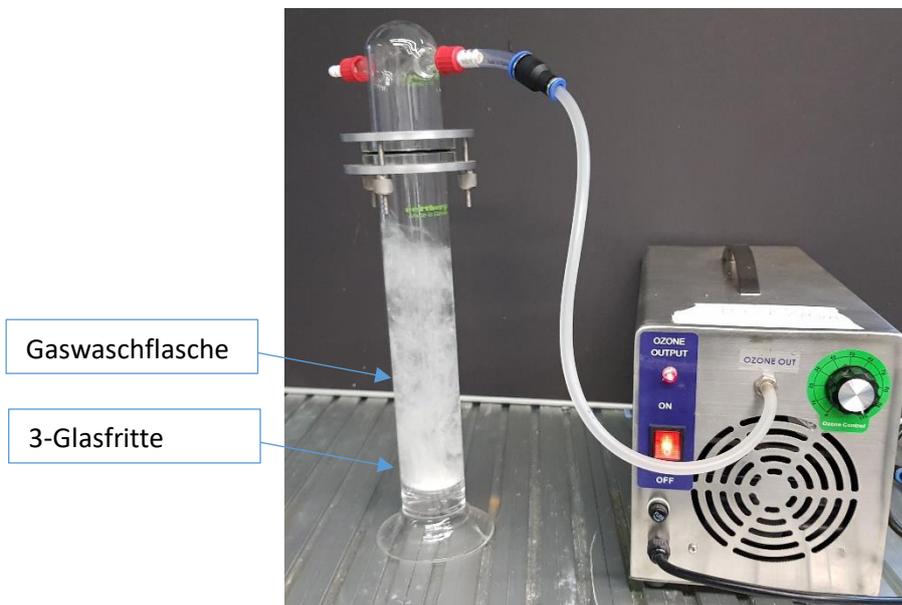
gegenüber dem Ozongenerator liegt bei dem Prozessgas. Dies kann in der Art und Menge variierend in den Plasmaentladungsbereich eingeleitet werden. Des Weiteren wird das Plasmaeffluent unmittelbar in die Flüssigkeit eingeleitet.

### Versuchsdurchführung Ozongenerator und Plasmaröhre

Die zwei Plasmaquellen wurden in Vorversuchen, zur Herstellung einer plasmaaktivierten Lösung (PAL), auf die einzelnen Kriterien untersucht. Die verwendete Ausgangslösung besteht aus deionisiertem Wasser unter Zugabe von TRIS-Puffer ( $C_4H_{11}NO_3$ ). Hierzu wurden Laboraufbauten entwickelt, die das spätere System widerspiegeln. Der TRIS-Puffer wird verwendet, um eine pH-Wert-Absenkung durch die Nitratbildung ( $HNO_3$ ) zu vermeiden. Der TRIS-Puffer wird auf einen pH-Wert von 8,0 bei 0,1 Mol eingestellt.

#### Ozongenerator

Die Abbildung 3 zeigt den Laboraufbau zur Erzeugung einer Plasmaaktivierten-Lösung unter Verwendung eines Ozongenerators (Kaufgerät).

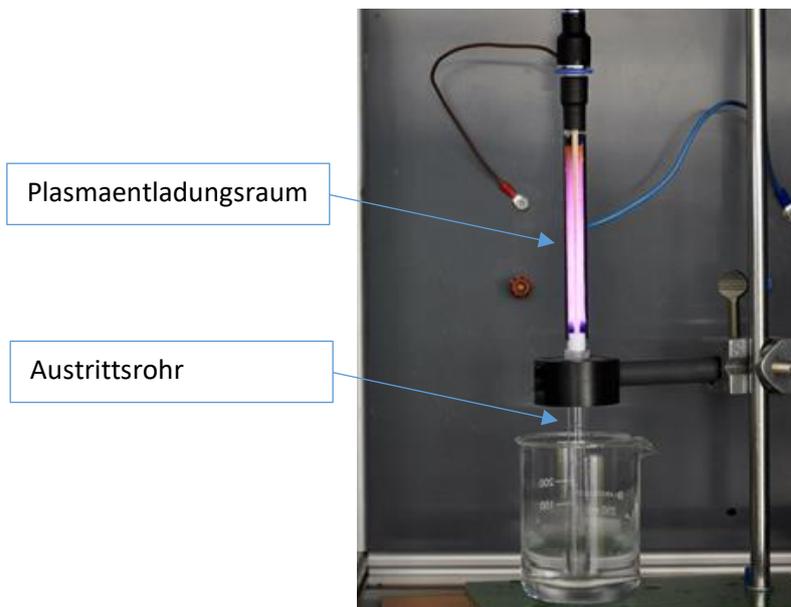


**Abbildung 3:** Laboraufbau mit einem am Markt erhältlichen Ozongenerator.

Bei diesem Quellenkonzept wurde eine Gaswaschflasche mit einer 3-Glasfritte verwendet. Diese Glasfritte dient dazu, dass sich das noch im Schlauch befindende Ozon, am Austritt in kleine Bläschen umzuwandeln. Da die Glasfritte sich in der PAL-Lösung (100 ml) befindet, kann die Verweilzeit der Gasbläschen in der PAL-Lösung über die Höhe der Wassersäule reguliert werden. Der vorhandene Volumenstrom mit 11,5 l/min am Ozongenerator WDH-WP15 ist konstant, da der integrierte Kompressor nicht einstellbar ist. Bei der ausgewählten Reglereinstellung (Ozone Control) von 100 %, produziert das Gerät 1,5 Gramm Ozon pro Stunde bei einer max. Leistungsaufnahme von 80 Watt.

## Plasmaröhre

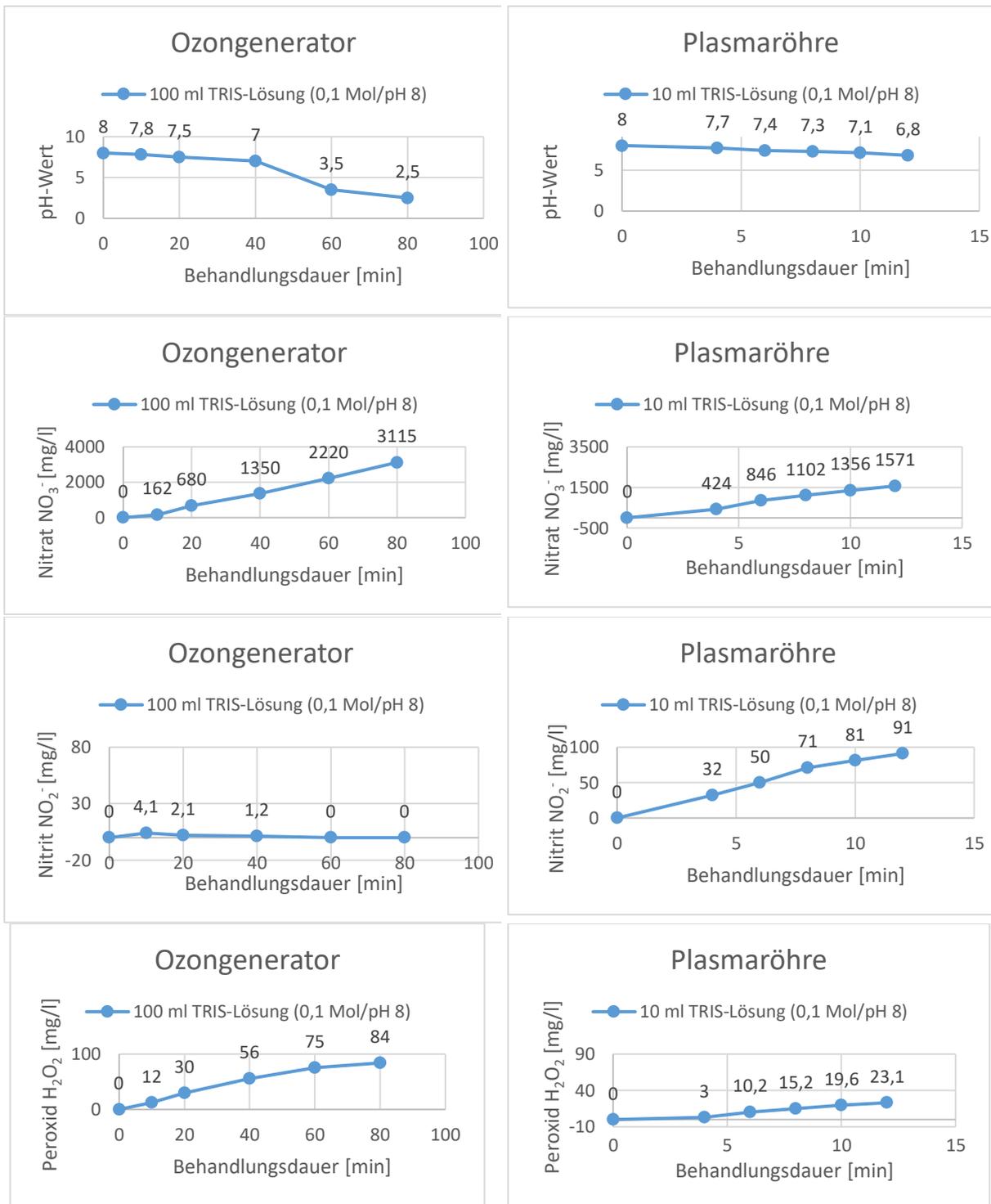
Die Abbildung 4 zeigt den Laboraufbau der Plasmaröhre. Der Plasmaentladungsraum ist bei diesem Aufbau gut zu erkennen. Die charakteristische violette Farbe des Plasmas entsteht, wenn als Prozessgas Umgebungsluft verwendet wird. Bei diesem Aufbau steckt das Austrittsrohr direkt in einem Becherglas mit der der PAL-Lösung (10 ml). Einen erheblichen Vorteil besitzt dieser Aufbau gegenüber dem des Ozongenerators, da kein weiteres Modul (Gaswaschflasche) benötigt wird. Die Plasmaröhre wird mit einer gepulsten Rechteckspannung bei 12 kV betrieben. Die Frequenz liegt bei 13,1 kHz. Der eingeleitete Volumenstrom des Prozessgases liegt bei 5 l/min.



**Abbildung 4:** Laboraufbau der Plasmaröhre.

## Ergebnisse und Versuchsauswertung zu Ozongenerator und der Plasmaröhre

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Ozongenerators und der Plasmaröhre gegenübergestellt. Dabei sind neben dem pH-Wert auch die Nitrat-, Nitrit und Peroxidkonzentration dargestellt. Sowohl beim Ozongenerator als auch bei der Plasmaröhre ist ein kontinuierlich linearer Anstieg des Nitratgehaltes festzustellen. Der pH-Wert bei beiden Quellen nimmt, dank des TRIS-Puffers nur sehr schwach ab. Allerdings ist ab einem bestimmten Nitratgehalt die Pufferkapazität ausgeschöpft und der pH-Wert sinkt signifikant ab. Dieser Effekt ist beim Ozongenerator nach einer Behandlungszeit von ca. 40 min zu beobachten (siehe folgende Grafiken).



**Abbildung 5:** pH-Wert, Nitrat-, Nitrit und Peroxidkonzentration des von den Geräten produzierten PAL.

Im Vergleich zu den ähnlichen linearen Verläufen beim Nitratgehalt, zeigte sich bei den Nitrit- und Peroxidkonzentrationen ein deutlicher Unterschied zwischen den Geräten. Der Ozongenerator erzeugt am Anfang einer Behandlung nur eine sehr geringe Menge Nitrit. Mit steigender Behandlungsdauer sinkt dieser unter die Nachweisgrenze ab. Die Plasmaröhre

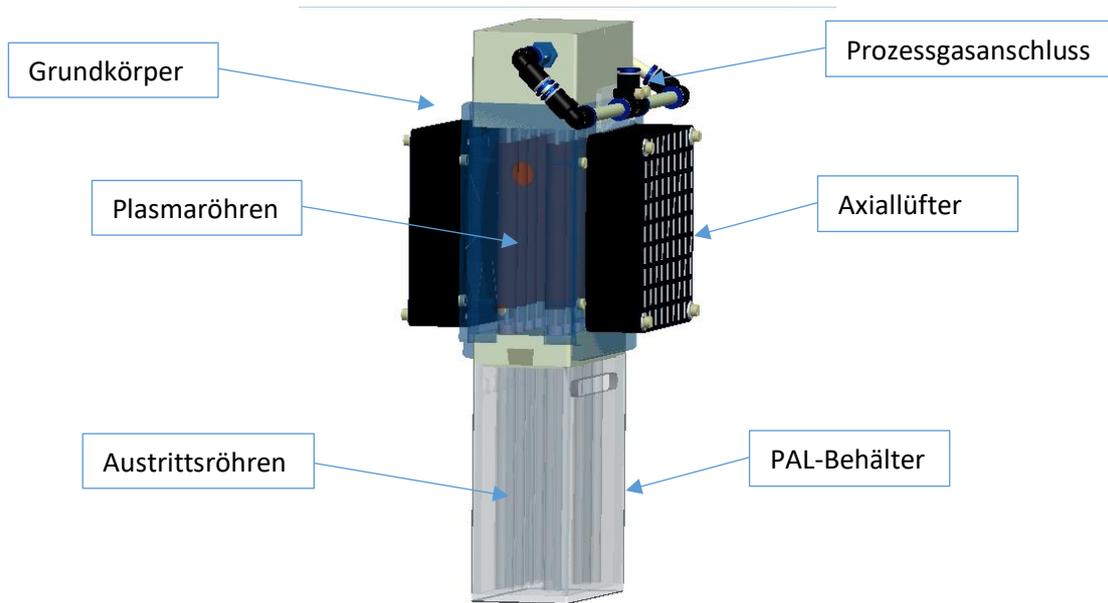
produziert mit fortlaufender Zeit kontinuierlich Nitrat in deutlich größeren Konzentration. Dahingegen zeigt sich bei der Peroxidbildung eine erhöhte Erzeugung bei dem Ozongenerator im Vergleich zur Plasmaröhre.

### Entwicklung und Konstruktion einer neuen Plasmaquelle

Die Ergebnisse der Wasseranalytik aus dem Kapitel 1.2 haben gezeigt das sowohl der Ozongenerator als auch die Plasmaröhre Nitrat, Nitrit und Wasserstoffperoxid erzeugen. In den ersten mikrobiologischen Untersuchungen zeigt sich, dass die plasmaaktivierte Lösung (PAL) von dem Ozongenerator keine antimikrobielle Wirkung aufweist, deshalb wurde eine weitere Verwendung dieses Aufbaus ausgeschlossen. Dahin gegen, zeigt die plasmaaktivierte Lösung der Plasmaröhre eine signifikante antimikrobielle Wirkung. Allerdings ist die Plasmaröhre für die Produktion der erforderlichen Menge von plasmaaktiviertem Wasser für die anstehenden Laboruntersuchungen nicht geeignet, da diese lediglich 10 ml pro Durchlauf erzeugen kann. Somit war eine Aufskalierung dieses Konzeptes zur Erzeugung von PAL notwendig.

### Plasmaröhren-Array

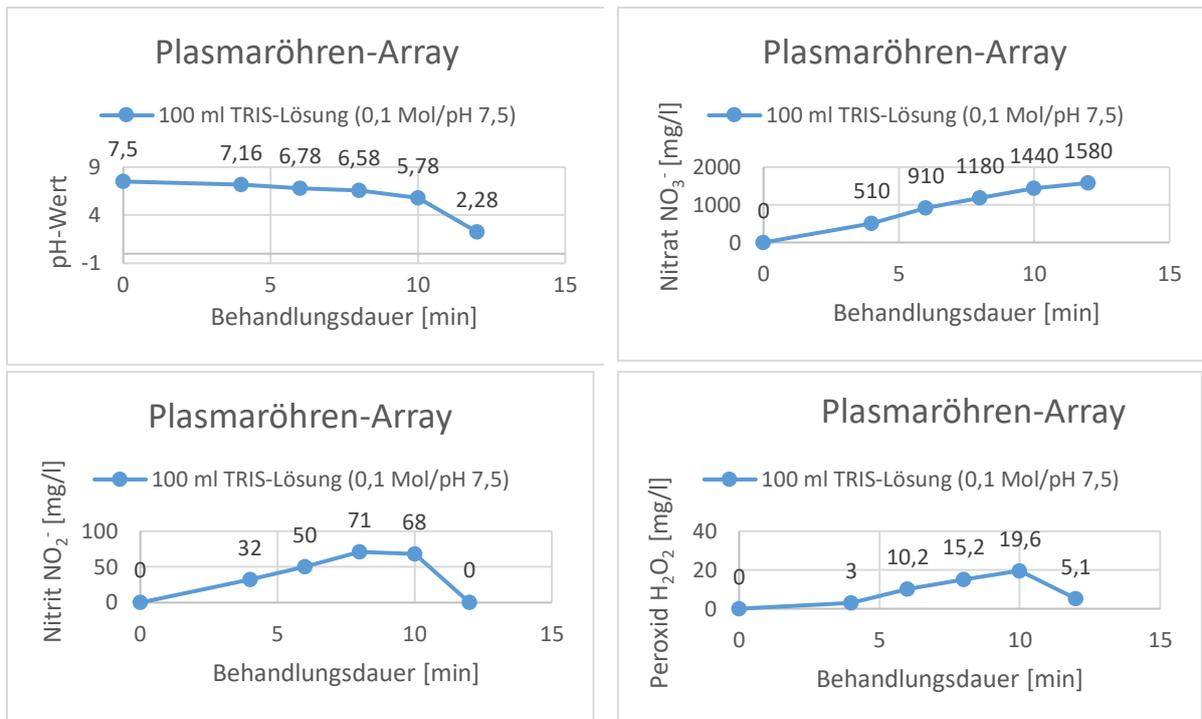
Um das Behandlungsvolumen pro Durchlauf erhöhen zu können, wurde die Anzahl der Entladungsröhren auf 10 erweitert. Diese Anzahl basiert darauf, dass bei den mikrobiellen Untersuchungen jeweils 100 ml verwendet werden. Um die sich daraus resultierende Steigerung der Wärmeentwicklung kompensieren zu können, muss eine aktive Kühlung installiert werden. Die aktive Kühlung wird aus zwei 12 V Axiallüftern realisiert. Der erforderliche Prozessgasanschluss befindet sich im oberen Bereich des Grundkörpers. Über einen Schlauchschnellverbinder wird das Prozessgas direkt in den Plasmaentladungsbereich eingespeist. Der austretende Luftstrom umströmt die einzelnen Keramiken der Plasmaröhren und kühlt diese somit effektiv. Die Austrittsröhren befinden sich unterhalb des Grundkörpers und reichen in den PAL-Behälter (siehe Abbildung 6)



**Abbildung 6:** CAD-Konstruktion Plasmaröhren-Array.

#### Ergebnisse und Versuchsauswertung Plasmaröhren-Array

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse des Plasmaröhren-Arrays dargestellt. Im Vergleich zu den Versuchen aus Kapitel 1.2 wurde der pH-Wert der TRIS-Pufferlösung von 8,0 auf 7,5 reduziert, um in einem neutraleren Startbereich zu liegen. Es wurden ebenfalls die pH-Werte und die Nitrat-, Nitrit und Peroxidkonzentrationen erfasst. Auch hier ist ein linearer Anstieg der Nitratkonzentration festzustellen. Auch die Nitrit- und Peroxidkonzentrationen zeigen einen fast identischen Verlauf, wie die der einzelnen Plasmaröhre. Somit ist festzustellen, dass das Ziel einer 10fach-Aufskalierung der Plasmaröhre zu einem Array erfolgreich umgesetzt wurde.



**Abbildung 7:** pH-Wert, Nitrat-, Nitrit und Peroxidkonzentration des vom Array produzierten PAL.

#### Optimierung des Elektrodenarrays

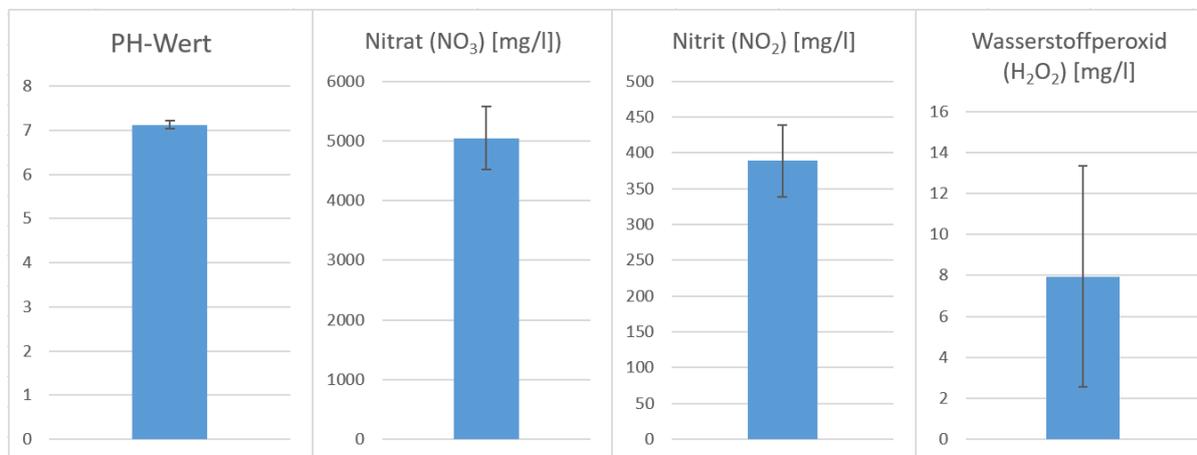
Die Herstellung der plasmaaktivierten Lösungen im Labor haben gezeigt, dass das Plasmaröhren-Array konstruktiver Optimierungen bedarf. Unter anderem wird eine höhere PAL-Volumenkapazität benötigt, damit für die antimikrobiellen Untersuchungen an der TiHo Hannover genügend PAL-Reserven bereitstehen bzw. im weiteren Projektverlauf für den Einsatz unter Realbedingungen größere Mengen an PAL zur Verfügung gestellt werden können und der Betrieb in robuster Umgebung gewährleistet ist. Ein wichtiger Aspekt liegt in der Wärmeabführung. Die vorhandenen zwei Axiallüfter erbringen nicht die erforderliche Kühlleistung um das Plasmaröhren-Array nach einem Behandlungsdurchgang von 20 Minuten auf 40 °C zu halten. Außerdem bedarf die Anordnung des Hochspannungsgenerators einer konstruktiven Änderung. Zurzeit ist die Kabellänge zwischen Hochspannungsgenerator und Elektrodenanschluss zu groß. Somit herrscht die Gefahr von Spannungsüberschlägen auf umliegende Bauteile des Plasmaröhren-Arrays. Ferner zeigt die Handhabung des Plasmaröhren-Arrays Defizite bei der Befüllung und Entnahme der plasmaaktivierten Lösungen auf. Des Weiteren sind einige der verwendeten Materialien empfindlich gegenüber Stoßbelastungen. Zusammenfassend zeigt sich, dass diverse Spezifikationen der aktuellen Konstruktion signifikante Defizite aufzeigen. Daher ist eine neue Konzeption/Konstruktion aus technischer Sicht sinnvoll (siehe auch AP A3 bzw. Gerät „Plasma-TJ“).

#### 2.4.3.2. Arbeitspaket A2 „Erarbeitung von optimierten Parameterräumen zur Eliminierung DD-relevanter Mikroorganismen mittels PAW“

Im Rahmen des Arbeitspaketes A2 wurden diverse Parametereinstellungen bei der PAL-Erzeugung untersucht. Es wurde unter anderem die Molarität des TRIS-Puffers, die (Plasma-

)Behandlungszeit sowie die Einwirkzeit bei der antimikrobiellen Prüfung variiert. Dabei lag das Hauptaugenmerk bei der antimikrobiellen Wirksamkeit. In Absprache mit der TiHo Hannover wurden folgende Parameter für die Testreihen der antimikrobiellen Wirksamkeit festgelegt:

- 100 ml deionisiertes Wasser mit 0,5 mol TRIS-Puffer (pH-Wert 7,5)
- 20-minütige Plasma-Behandlungszeit
- 1-minütige Einwirkzeit



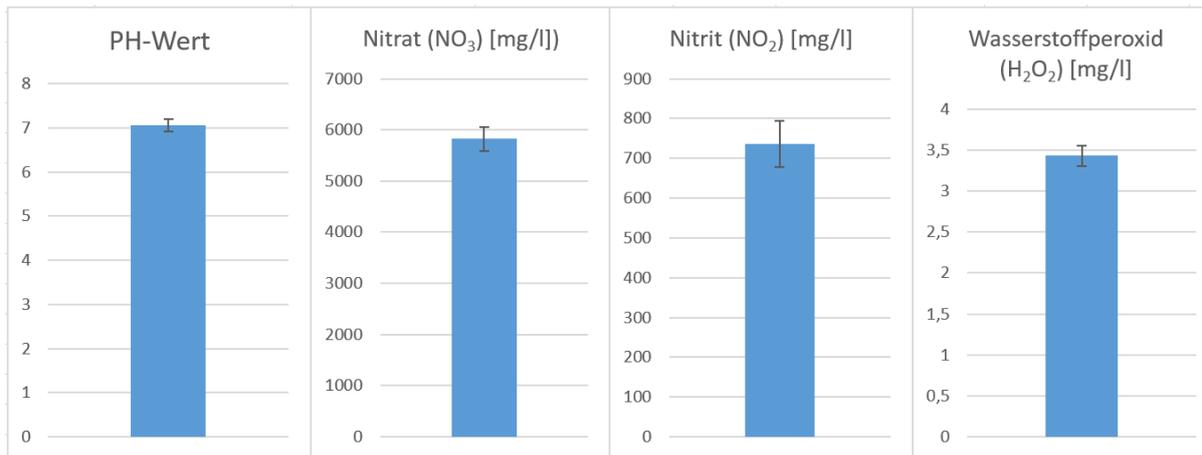
**Abbildung 8:** Wasseranalytik Plasmaröhren-Array (n = 42).

In der Abbildung 8 sind die wasseranalytischen Messwerte (pH, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) des Plasmaröhren-Arrays (EA) dargestellt. Die Messdaten beruhen auf insgesamt 42 PALs die im Verlauf des Arbeitspaketes A2 erzeugt wurden und anschließend zur TiHo Hannover verschickt wurden. Bei der Wasseranalytik kann festgestellt werden, dass der pH-Wert von einem Ausgangswert 7,5 auf 7 absinkt. Außerdem wird durch die Plasmabehandlung Nitrat (~5000 mg/l), Nitrit (~390 mg/l) und Wasserstoffperoxid (~7,9 mg/l) in der Pufferlösung gebildet.

Im Arbeitspaket 2 wurde neben der umfangreichen Analytik des Plasmaröhren-Arrays mit der Parametrisierung des Plasma-TJs begonnen. Dabei wurden die Molarrität des Puffers sowohl die Einwirkzeit aus den Versuchen mit dem Plasmaröhren-Array übernommen. Es wurde lediglich die (Plasma-)Behandlungszeit und das PAL-Volumen der neuen Plasmaquelle angepasst und variiert:

- 500 ml deionisiertes Wasser mit 0,5 mol TRIS-Puffer (pH-Wert 7,5)
- 75-minütige Plasma-Behandlungszeit
- 1-minütige Einwirkzeit

In der Abbildung 5 sind die wasseranalytischen Messwerte (pH, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) des Plasma-TJs dargestellt. Die Messdaten beruhen auf insgesamt drei PALs die im Verlauf des Arbeitspaketes A2 erzeugt wurden und anschließend zur TiHo Hannover verschickt wurden. Bei der Wasseranalytik kann festgestellt werden, dass der pH-Wert von einem Ausgangswert 7,5 auf 7 absinkt. Außerdem wird durch die Plasmabehandlung Nitrat (~5800 mg/l), Nitrit (~740 mg/l) und Wasserstoffperoxid (~3,4 mg/l) in der Pufferlösung gebildet.



**Abbildung 9:** Wasseranalytik Plasma-TJ (n = 3).

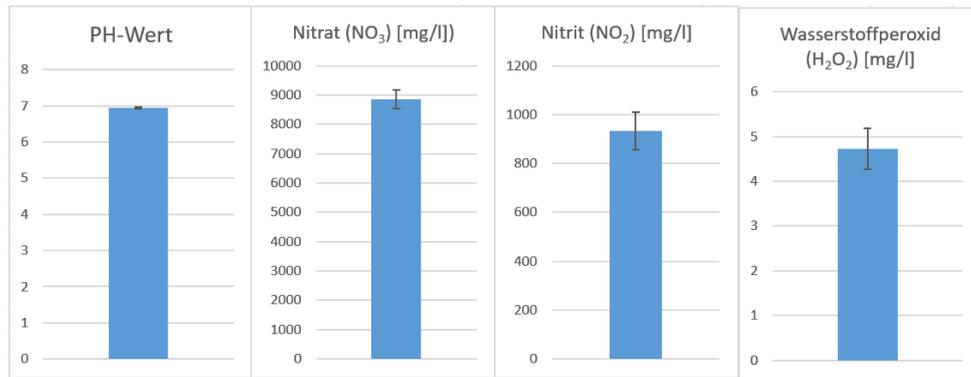
Anhand der Wasseranalytik des Plasma-TJs ist zu erkennen, dass die Werte (pH, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), im Vergleich zum Plasmaröhren-Array, in einem ähnlichen Bereich liegen. Vorläufige biologische Untersuchungen an der TiHo Hannover ließen auf eine gleichwertige antimikrobielle Wirkung schließen. Damit wurde eine grundsätzliche Eignung der Neuentwicklung für die Herstellung größerer Mengen mikrobiziden PAWs nachgewiesen.

Im weiteren zeitlichen Verlauf des Arbeitspaketes A2 wurden die Parameter anhand von Versuchen variiert um die Herstellung von PAW effektiver realisieren zu können. Dies beinhaltet ein möglichst großes Volumen an PAW in kürzerer Zeit herzustellen, damit bei den späteren Anwendungen im Stall (Rinderklauen), eine ausreichende Wirtschaftlichkeit gewährleistet ist. Der Fokus liegt dabei auf der Erzeugung hoher Konzentrationen bei möglichst kurzen Behandlungsdauern. Dafür wurden die Startparameter erneut empirisch ermittelt (siehe Tabelle 1). Auf eine antimikrobielle Wirksamkeit, wird zu diesem Zeitpunkt der Parameterfindung bewusst verzichtet, da es sich zunächst um die Einstellung des Plasma-TJs handelt. Hausintern werden jedoch die Wasserwerte von NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und pH kontinuierlich bestimmt.

**Tabelle 1:** Optimierte Parameter

Parameter	Startparameter	Optimierte Parameter
Wasservolumen (ml)	500	250
Behandlungsdauer (min)	75	30
Eingekoppelte Leistung (Watt)	500	750
Volumenstrom (Prozessgas) (l/min)	120	50

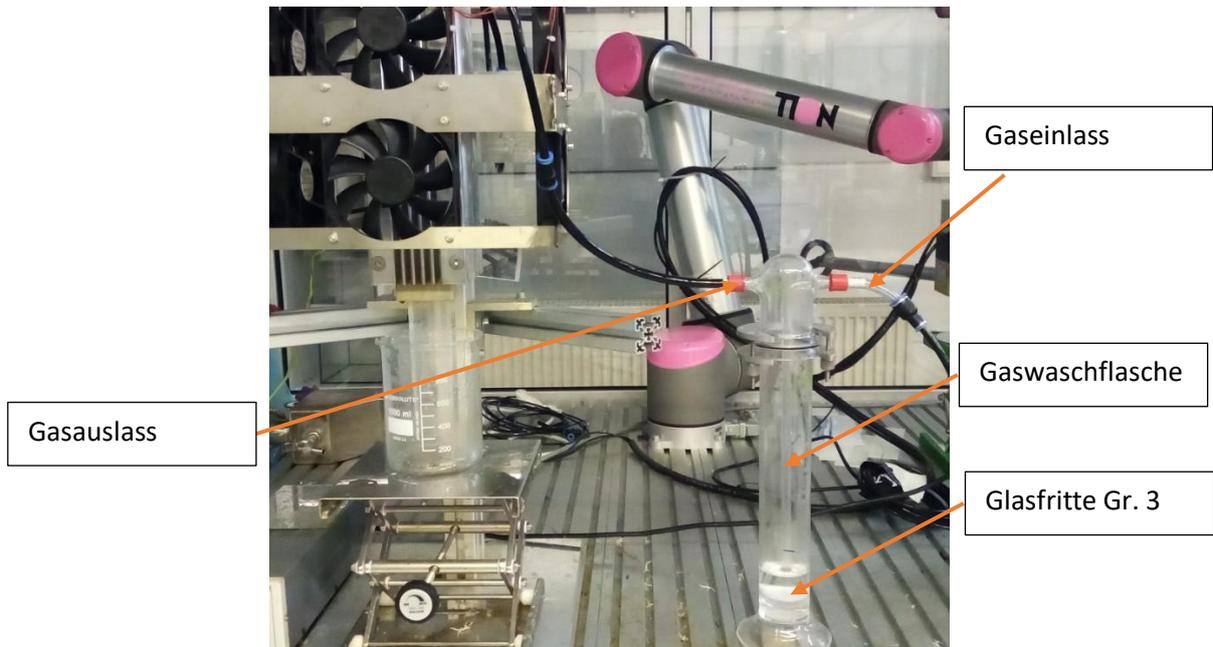
Mit den optimierten Parametern wurde eine Versuchsreihe mit n=6 durchgeführt (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Wasseranalytik Plasma-TJ (n = 6).

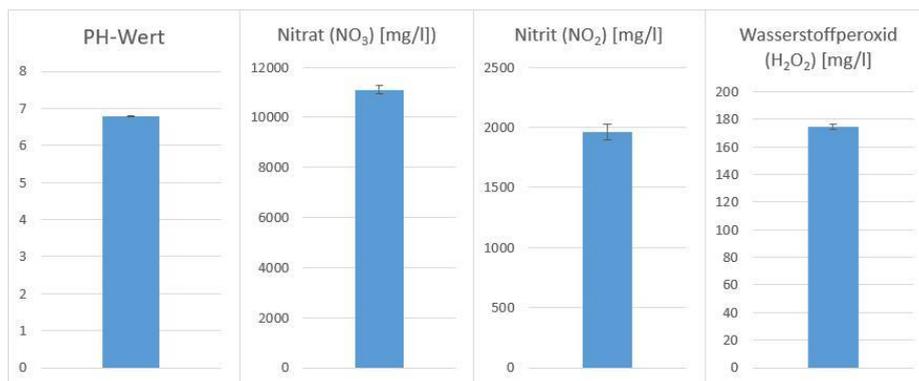
Die Optimierung des Parametersatzes hatte zur Folge, dass die Wasserleitwerte die Werte der Startparameter übertrafen. Der pH-Wert ändert sich nicht signifikant und liegt im Mittelwert bei 6,94. Die anderen Messwerte ergaben im Mittelwert für NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 8855,3 mg/l, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 933,85 mg/l und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4,73 mg/l. Ein weiterer erwähnenswerter Aspekt liegt im wirtschaftlichen Bereich, da die Behandlungszeit pro Durchgang auf 30 Minuten reduziert und der Volumenstrom des Prozessgases auf 50 l/min herabgesetzt werden konnte. Zwar wird jetzt eine 2-fache Behandlung benötigt, mit jeweils 250 ml, um das Ausgangsvolumen von 500 ml bei den Startparametern zu erreichen, aber die reine Behandlungszeit verkürzt sich um 15 Minuten.

Des Weiteren wurde die Hypothese überprüft, dass sein anfeuchten des Prozessgases vor dem Einlass in die Plasma-Entladungszone eine Steigerung der Effizienz bei der Produktion von PAW zur Folge hat. Somit sollten die in der Plasmaentladung erzeugten reaktiven Spezies mit der PAW-Lösung besser reagieren können. Dadurch müssten die Werte von NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> steigen, jedoch sollte sich der pH-Wert nicht ändern. Umgesetzt wird diese Anfeuchtung des Prozessgases mittels einer Gaswaschflasche, die mit Leitungswasser gefüllt ist. Der Druckluftschlauch ist an der Gaswaschflasche angeschlossen. Über ein Glasrohr wird die Druckluft durch eine Glasfritte mit der Porengröße 3 geleitet. Die Glasfritte befindet sich direkt im Leitungswasser. Durch die feinporige Struktur der Glasfritte wird die Druckluft in sehr kleine Blasen zerlegt und sorgt somit für eine große Oberfläche, somit wird die Anfeuchtung effektiver. Anschließend gelangt die so angefeuchtete Druckluft direkt in den Plasmaentladungsraum des TJs. In der Abbildung 11 ist der Laboraufbau des Plasma-TJ mit angeschlossener Gaswaschflasche dargestellt.



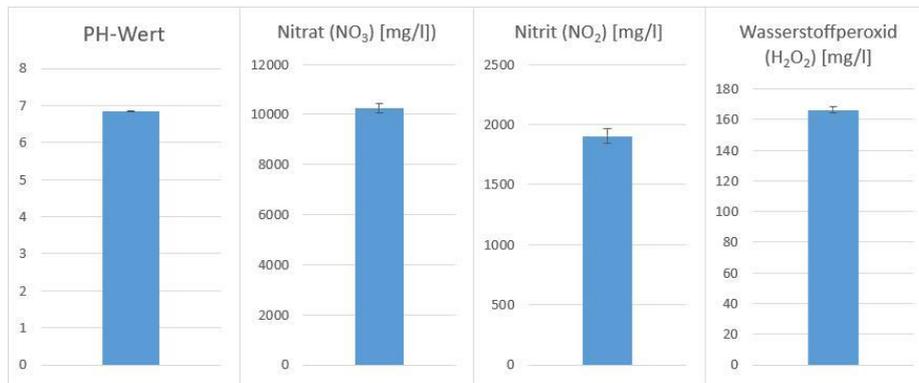
**Abbildung 11:** Laboraufbau Plasma-TJ mit Gaswaschflasche.

Um die Hypothese zu überprüfen, wurden der optimierte Parametersatz (siehe Tabelle 1) zum Betrieb des Versuchsaufbaus verwendet. Für eine schnelle Aussage, wurde zu nächst lediglich eine Versuchsreihe mit n=3 durchgeführt.



**Abbildung 12:** Wasseranalytik Plasma-TJ + Gaswaschflasche (n = 3).

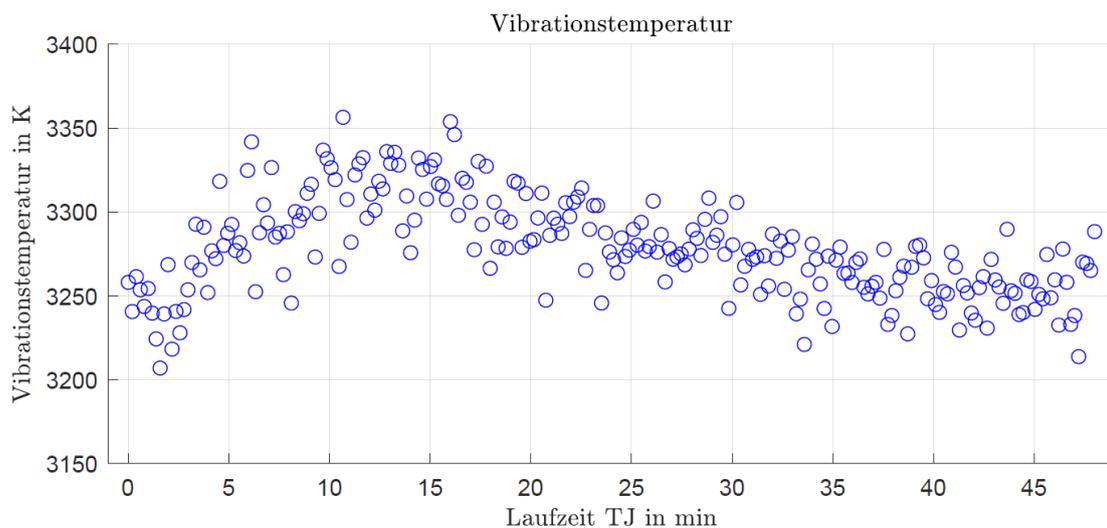
Die Abbildung 12 stellt die Werte grafisch da. Anhand der Messwerte, konnte die Annahme, dass durch das Anfeuchten des Prozessgases eine höhere Effektivität der PAW-Produktion erzielt wird, bestätigt werden. Es wurden im Mittelwert bei pH 6,79, Nitrat 11100 mg/l, Nitrit 1960 mg/l und Wasserstoffperoxid von 170 mg/l gemessen. Um die Abschätzungen zu validieren, wurde im nächsten Arbeitsschritt die Versuchsdurchführung wiederholt, diesmal mit n=9 (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Wasseranalytik Plasma-TJ + Gaswaschflasche (n = 9).

Mit dieser Versuchsreihe (n=9), konnte die Hypothese erneut bestätigt werden. Die Werte von NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind, bei Verwendung des ansonsten unveränderten Parametersatzes eindeutig angestiegen. Für die Nitratkonzentration wurde ein Mittelwert von 10240 mg/l, bei Nitrit von 1900 mg/l und Wasserstoffperoxid 170 mg/l gemessen. Zudem ist gut zu erkennen, dass die Standardabweichung wiederum gering ausfällt. Diese geringe Abweichung ist ein Hinweis darauf, dass der Plasma-TJ stabil betrieben werden kann und so eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet wird.

Durch die Auswertung spektralanalytischer Langzeitmessungen mittels Echelle-Spektrometrie konnte ebenfalls ein stabiler Betrieb der Plasmaquelle bestätigt werden. Durch Bestimmung der Intensität und Bandenlage wurde sowohl die Elektronentemperatur als auch die Vibrationstemperatur des mit den obengenannten Parametersatzes betriebenen TJ im Plasmavolumen berechnet, die lediglich um Werte zwischen 7,0 – 7,7 eV bzw. 3200 – 3400 K streuen (siehe Abbildung 14).



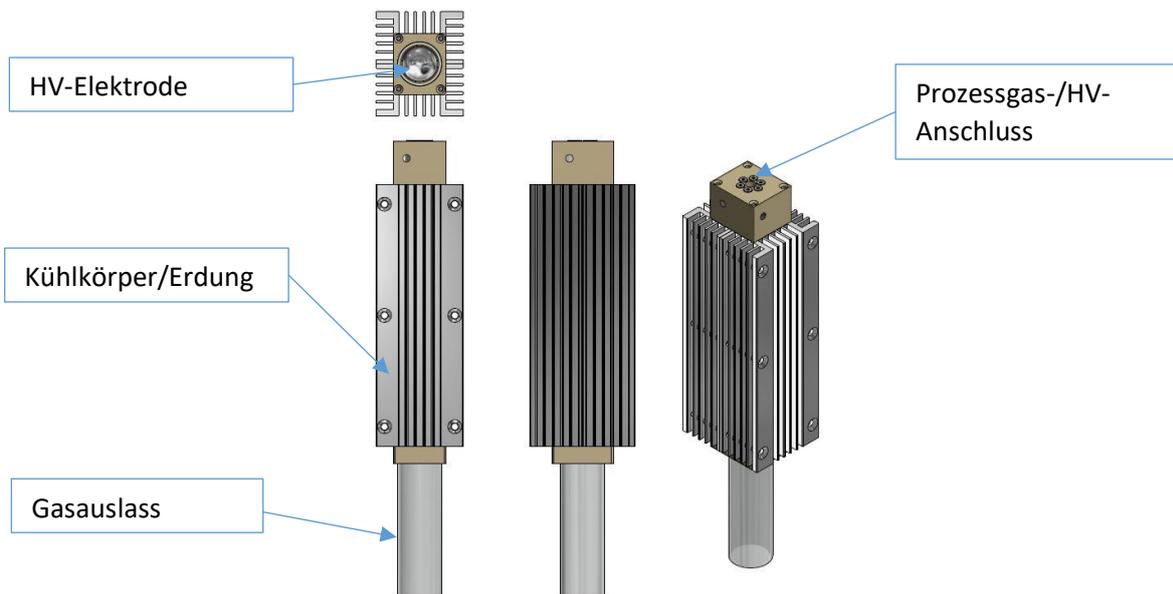
**Abbildung 14:** Zeitlicher Verlauf der Vibrationstemperatur innerhalb des Plasmavolumens der Quelle.

Ein weiterer essentieller Aspekt liegt in dem pH-Wert, im Mittelwert von 6,84. Dieser befindet sich weiterhin in einem akzeptablen Bereich für die Behandlung der Rinderklauen. Mit diesen Einstellungen werden im weiteren Verlauf des Projektes PAW-Proben hergestellt und zur Überprüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit an die TiHo-Hannover gesendet

#### 2.4.3.3. Arbeitspaket A3 „Entwicklung und Konstruktion einer skalierten Anlage zur PAW-Herstellung“

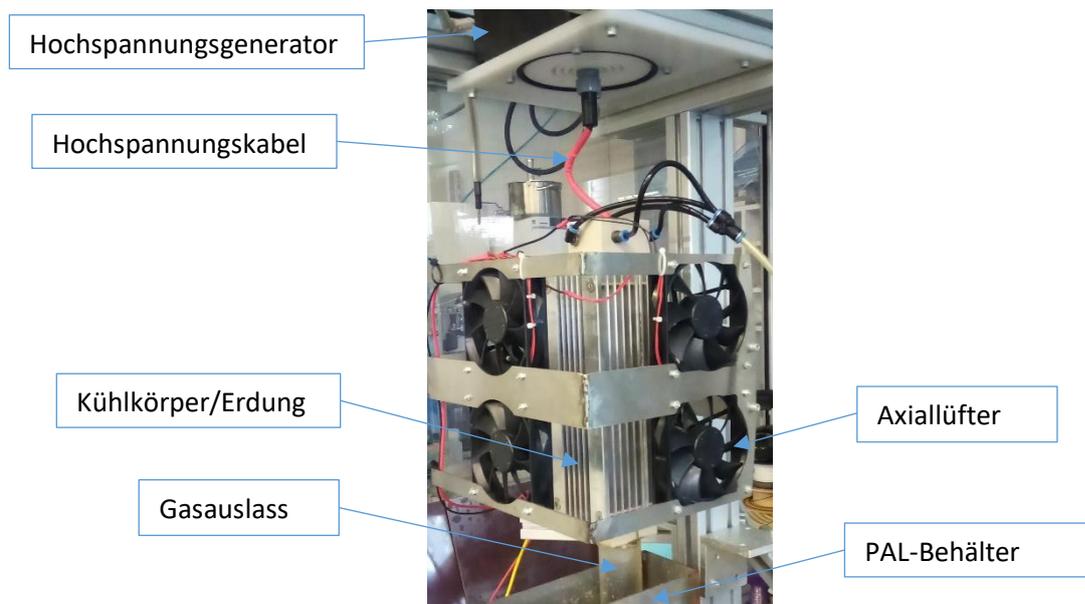
Das Arbeitspaket 3 beinhaltet die Entwicklung und Konstruktion einer skalierten Anlage zur PAW-Herstellung für den Praxis-Einsatz im Stall. Die Basis für die skalierte Anlage beruht auf den bisherigen Laboraufbauten. Da es sich um eine Anlage handeln soll, die für den robusten Einsatz im Rinderstall konzipiert wird, müssen entsprechende robuste und (korrosions-)resistente Materialien verwendet werden. Die Auswahl der Materialien ist essenziell, da die Anlage im Praxiseinsatz mit verschiedensten Substanzen in Kontakt treten kann. Hierzu zählen unter anderem Fäkalien, Reinigungsmittel, Diesel, Öle und weitere Betriebsstoffe.

Die Konstruktion und Entwicklung der Anlage wird mittels computergestützter Verfahren (z.B. Autodesk Inventor 2021) in Kooperation mit dem Landwirt realisiert. Der Fokus liegt auf der Erzeugung hoher Konzentrationen der Wasserwerte bei möglichst geringer Behandlungszeit. Mit der Entwicklung und Konzeption des Plasma-TurboJets (Plasma-TJ), sollten die im vorherigen Kapitel erwähnten Mängel des Plasmaröhren-Arrays beseitigt und eine größere Menge an Plasmawasser herstellbar werden. In der Abbildung 2 ist der technische Aufbau des Plasma-TJs dargestellt. Der deutlich vergrößerte Aluminiumkühlkörper ist so konzipiert, dass durch die Rippen eine große Kühlfläche realisiert wird. Diese Kühlleistung ist erforderlich, um den Kühlkörper konstant auf Umgebungstemperatur zu halten. Gleichzeitig dient der Kühlkörper auch als Erdung. Im Vergleich zum Plasmaröhren-Array (10 Elektroden) wird beim Plasma-TJ lediglich nur noch eine Hochspannungselektrode eingesetzt. Über den Prozessgas-/HV-Anschluss gelangt das Prozessgas (Luft) in den Entladungsraum der Plasmaquelle. Ebenso befindet sich in diesem Anschluss auch die Hochspannungskontaktierung für die HV-Elektrode. Als Dielektrikum zwischen Kühlkörper und Hochspannungselektrode wird ein Quarzglasrohr ( $\text{SiO}_2$ ) verwendet. Dieses Quarzglasrohr dient auch als Gasauslass, der sich im PAL-Behälter befindet (siehe Abbildung 15). Das (Plasma-)Volumen zwischen Hochspannungselektrode und Quarzglasrohr ist dabei wesentlich größer als bei dem Plasmaröhren-Array.



**Abbildung 15:** CAD-Aufbau Plasma-TJ.

In der Abbildung 16 ist die Anbringung des Hochspannungstransformators über dem Plasma-TJ zu sehen. Diese Platzierung ist so gewählt, dass das Hochspannungskabel zwischen Transformator und Plasma-TJ so kurz wie möglich ist. Durch die Anordnung von sechs 24V-Axiallüftern, wird jederzeit für einen ausreichenden Luftstrom auf den Kühlkörper gesorgt. Für die Herstellung größerer Mengen an PAL ist auch für dieses Quellenkonzept eine Arrayanordnung mehrerer TJ-Einheiten vorgesehen. Theoretisch ist es so möglich -- bei ausreichend hoher Versorgerleistung – beliebig viele Einheiten parallel zu betreiben und so die Herstellung von großen Mengen PAL mit mikrobizider Wirkung zu gewährleisten



**Abbildung 16:** Laboraufbau Plasma-TJ.

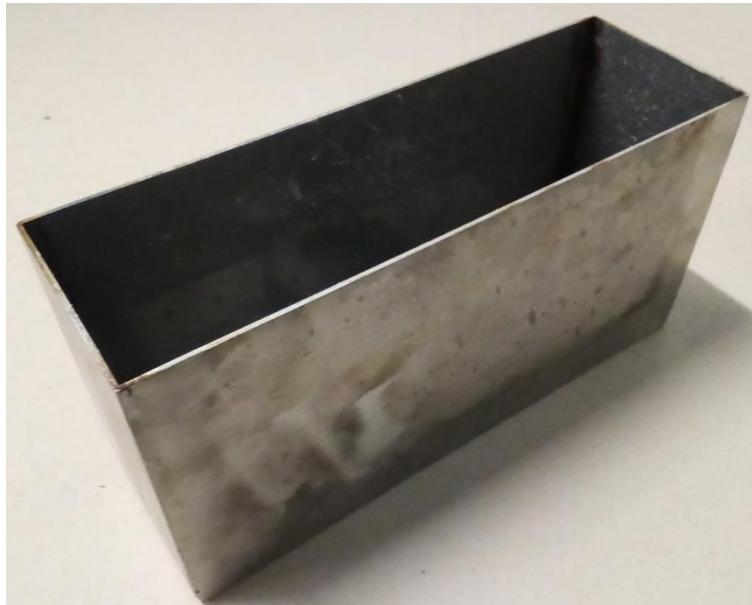
## Anlagenaufbau

Das Gesamtsystem der Anlage besteht aus folgenden Einheiten:

- PAW-Tank
- Plasmaquelle
- Autarke Druckluftversorgung
- Gestell
- Einhausung
- Hochspannungsversorgung

### PAW-Tank

Das erste Tankmodell PAW-Tank-A (siehe Abbildung 17) besteht aus 1.4301 (X5CrNi18-10-Stahl). Der Aufbau wurde an HAWK durchgeführt. Dazu wurden 2 mm Blechteile mit einem Faserlaser ausgeschnitten und anschließend mittels WIG-Schweißverfahren zusammengefügt. Anhand des ersten Tanks wird geprüft, ob das gewählte Material für das PAW geeignet ist.

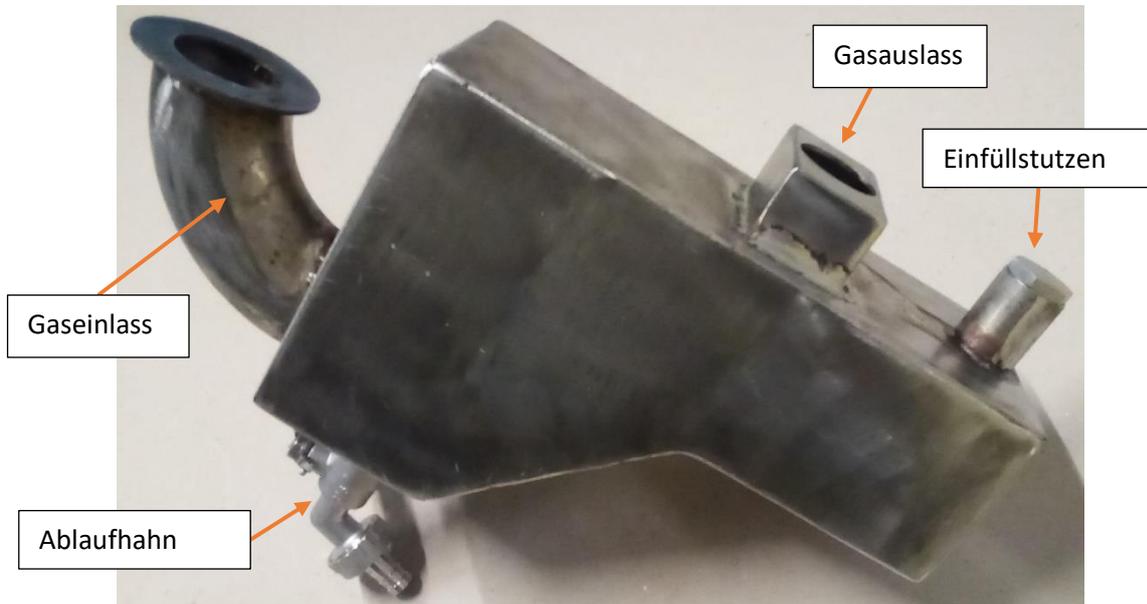


**Abbildung 17:** PAW-Tank-A.

Nach der Produktion von PAW in dem PAW-Tank-A zeigten sich im inneren Bereich Roststellen. Aus diesem Grund wurde auf den 1.4571 (X6CrNiMoTi17-12-2-Stahl) gewechselt. Es handelt sich um einen nichtrostenden austenitischen Titan-stabilisierten Chrom-Nickel-Molybdän-Stahl. Dieser Stahl ist unter anderem gegen Meerwasser, verdünnte Schwefel- und Salzsäuren beständig. Weiterhin besitzt dieser Stahl eine hohe Beständigkeit gegen interkristalline Korrosion nach Schweißvorgängen. Der Tank aus 1.4571 wies nach dem Herstellen vom PAW keine Roststellen auf.

Im weiteren zeitlichen Verlauf wurde der PAW-Tank-B funktionell angepasst (siehe Abbildung 18). Es befindet sich seitlich der Gaseinlass für das Plasmagas bzw. Plasma-Effluent. Auf der

Oberseite befindet sich ein Gasauslass, aus diesem tritt das eingelassene Gas wieder aus dem Tank aus. Der Einfüllstutzen, zum Befüllen des Tanks sitzt ebenfalls auf der Oberseite. Unterhalb vom Tank ist ein angeschweißter Edelstahl-Ablaufhahn platziert. Das maximale Füllvolumen beträgt 1500 cm<sup>3</sup>.



**Abbildung 18:** PAW-Tank-B.

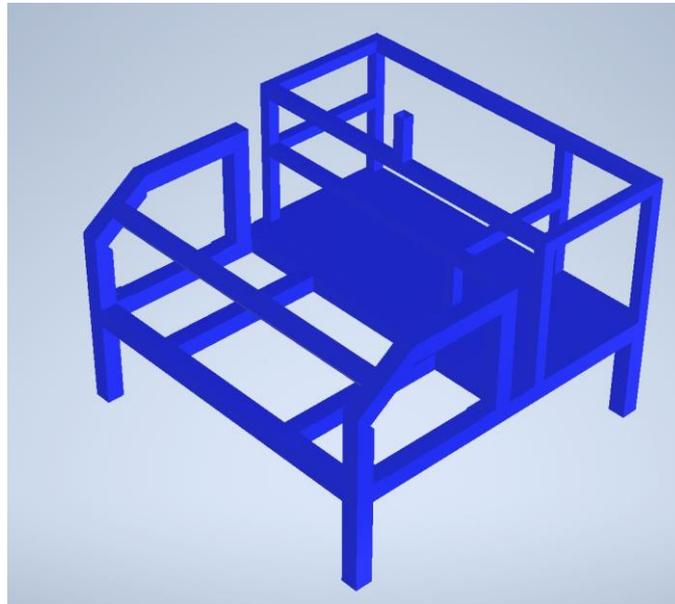
Der Tankaufbau hat sich in der Praxis bewährt. Für eine Optimierung würde noch in Betrachtung kommen, den Tankaufbau aus einem schlagzähen Kunststoff zu entwickeln. Weiterhin wird zurzeit das Arbeitspaket 3 mit der Konzeptionierung und Konstruktion der verbleibenden Anlageneinheiten fortgeführt. Im weiteren zeitlichen Verlaufs des Projektes haben sich durch konstruktive Diskussionen mit dem Landwirt Markus Borchardt Änderungen am Anlagenkonzept ergeben. So hat sich z.B. herauskristallisiert, dass ein starr verbauter PTW-Tank laut Anlagenkonzept 1 nicht praktikabel ist. Dieser würde die Bedienung der Anlage signifikant erschweren. Ein Lösungsansatz für diese Diskrepanz liegt in der Verwendung eines austauschbaren Behälters. Der komplette Aufbau der Anlage erfolgt sukzessiv. Somit können Anpassungen der einzelnen Komponenten direkt an der Anlage erfolgen. Aus diesen Diskussionen hat sich das Anlagenkonzept 2 ergeben.

#### Anlagenkonzept 2

Das Gesamtsystem der Anlage besteht aus folgenden Komponenten:

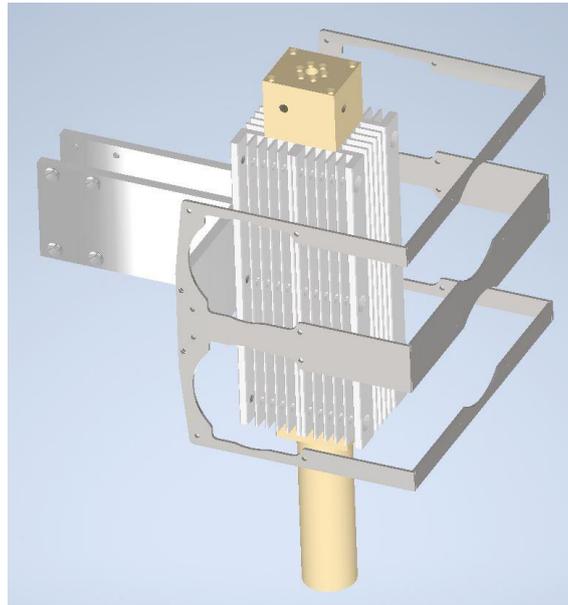
- Austauschbarer PAW-Behälter
- Plasmaquelle
- Autarke Druckluftversorgung
- Stromverteiler
- Anlagengrundgestell
- Schutzeinhausung
- Hochspannungsversorgung

Im ersten Arbeitsschritt entsteht mittels 3D CAD Programm ein Anlagengrundgestell. Dieses entsteht aus 60x60x3 mm<sup>3</sup> S235JR-Rohr, siehe Abbildung 19. Das Anlagengrundgestell dient als Trägermodul für alle weiteren Anlagenkomponenten. Hierbei muss auch auf die spätere Robustheit geachtet werden, so dass die gesamte Anlage z.B. über das Anlagengrundgestell mittels Frontlader am Traktor transportiert und platziert werden kann. Ein weiterer essenzieller Aspekt liegt in der anschließenden Schutzlackierung, da das Anlagengrundgestell mit verschiedensten Substanzen in Kontakt treten könnte. Hierzu zählen unter anderem Fäkalien, Reinigungsmittel, Diesel, Öle und weitere Betriebsstoffe.



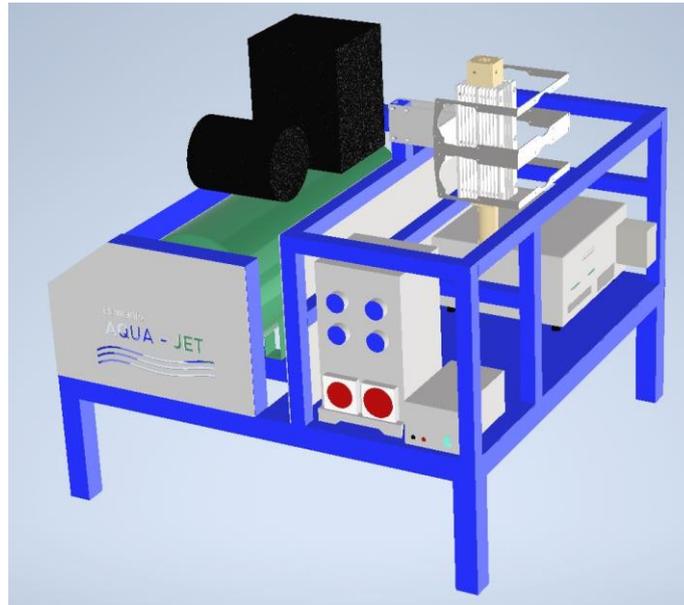
**Abbildung 19:** Anlagengrundgestell

An das Anlagengrundgestell wird die Plasmaquelle, siehe Abbildung 20, konstruktiv angepasst. Aus dem ursprünglichen TJ wurde der TJ-L. Bei der Version TJ-L liegt das Hauptaugenmerk auf dem Keramikrohr aus  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Da die Keramik eine deutlich bessere mechanische Robustheit aufweist, als das vorher verwendete Quarzglasrohr. Hinzukommend wurden noch die geometrischen Abmaße der Plasmaquelle dem Anlagengrundgestell angepasst.



**Abbildung 20:** Plasmaquelle TJ-L.

Im vorderen Bereich des Grundgestells befindet sich die autarke Druckluftversorgung. Hierbei handelt es sich um einen Metabo 550-90 D, 380 Volt Doppelkolben-Kompressor. Mit dem Tankvolumen von 90 Litern bei einem max. Druck von 10 bar, besitzt der Kompressor ausreichend Reserve zum gleichzeitigen Betreiben der Plasmaquelle und Druckluftentnahme für weitere Druckluftwerkzeuge wie z.B. einer Ausblaspistole zum Reinigen der Anlage. Zum Schutz des Kompressors gegen äußerliche Beschädigungen dient ein Rohrrahmen. Dieser ist über Schrauben demontierbar. So kann eine Wartung des Kompressors leicht erfolgen. Im hinteren Bereich sollen die Hochspannungsversorgung TANTEC HVX-20 für den Betrieb der Plasmaquelle TJ-L und ein 24 V Netzgenerator für die Spannungsversorgung der aktiven Plasmaquellenkühlung mittels Axiallüfter platziert werden. Zudem befindet sich auch in diesem Bereich ein CEE-Standstromverteiler STECKY 12 CEE-Stecker 400V,32 A,5-polig AS-SCHWABE (siehe Abbildung 21). An den Stromverteiler werden alle elektrischen Verbraucher angeschlossen. Als Anschlussleitung für den Stromverteiler dient eine 5m lange 380 V, 32 A, 5-polige Leitung.



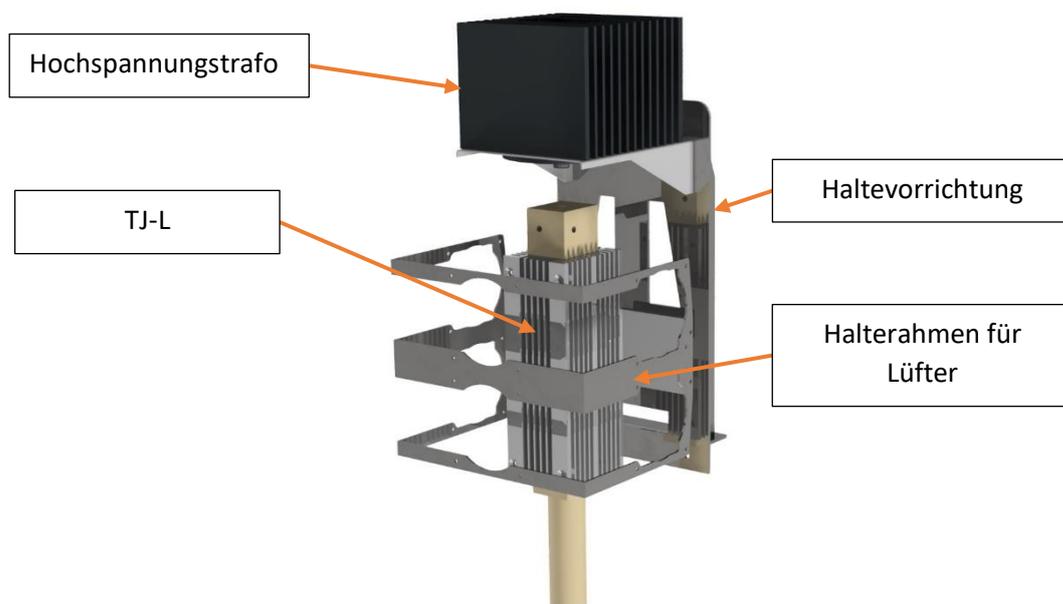
**Abbildung 21:** Anlagengrundgestell mit Anlagenkomponenten.

Nach der Erstellung des Grundgestells mit Anlagenkomponenten als 3D Modell (Abbildung 21) wurde das Anlagengrundgestell in der hauseigenen Werkhalle der HAWK komplett gefertigt (Abbildung 22). Dies beinhaltete die zerspannende Fertigung, das Verschweißen der einzelnen Stahlbauteile und die anschließende Schutzlackierung. Bei der Schutzlackierung handelt es sich nicht nur um einen Schutz gegen Durchrostung, sondern auch um einen Schutz gegen weitere äußere Einflüsse wie z.B. Fäkalien, Reinigungsmittel, Diesel, Öle und eventuelle weitere Betriebsstoffe gewährleisten zu können.



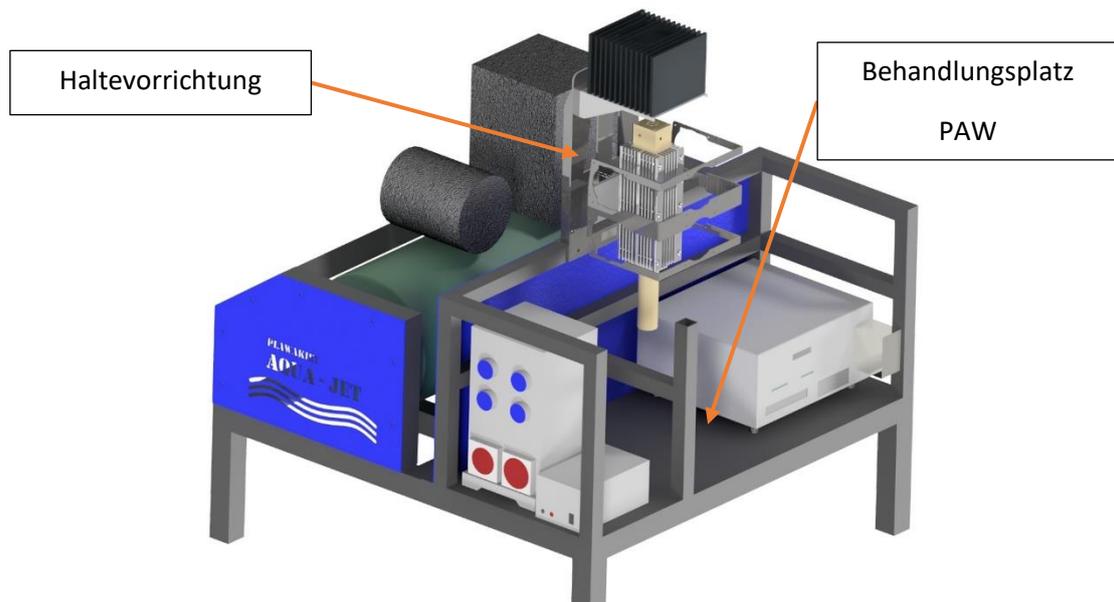
**Abbildung 22:** Grundgestell mit Kompressor.

Nach der Fertigstellung des Anlagengrundgestells, wurde im nächsten Arbeitsschritt die Haltevorrichtung für die Plasmaquelle TJ-L zunächst mittels 3D CAD-Programm Autodesk Inventor 2021 konzipiert, dabei standen mehrere Konstruktionselemente in besonderen Fokus: Zunächst sollte die Haltevorrichtung aus dem Werkstoff Stahl bestehen, da mit diesem Werkstoff die größtmöglichen Freiräume und Flexibilität hinsichtlich der Fertigung gegeben sind. Ein nächster wichtiger Aspekt liegt in der sicheren Aufnahmemöglichkeit des Hochspannungstrafo. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass das aus dem Trafo kommende Hochspannungskabel nicht die Haltevorrichtung bzw. das Anlagengrundgestell berührt, da hier die Gefahr eines Kurzschlusses besteht bzw. das Grundgestell unter Strom stehen könnte. Des Weiteren musste die Haltevorrichtung von den geometrischen Abmaßen her so geplant werden, dass sich die Plasmaquelle weder zu nah noch zu fern von dem Hochspannungstrafo befindet. Damit wird eine optimale mechanisch belastende Ausnutzung der Hochspannungskabellänge gewährleistet. Weiterhin soll die Haltevorrichtung leicht demontierbar vom Anlagengrundgestell sein, um einen leichten Zugang für Wartungsarbeiten und/oder Austausch von Anlagen-Elementen zu gewährleisten. Die Abbildung 23 zeigt das Konzept der Haltevorrichtung mit eingebauter Plasmaquelle TJ-L und Hochspannungstrafo. Die Haltevorrichtung besitzt auch einen Halterahmen für Axiallüfter, die im späteren Betrieb die Wärmeabfuhr der Plasmaquelle gewährleisten sollen.



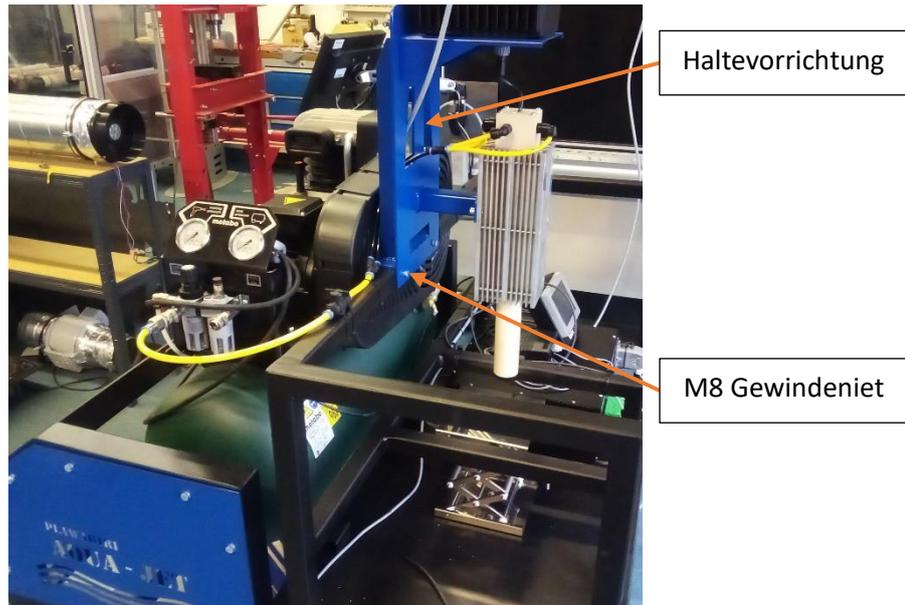
**Abbildung 23:** Konzept Haltevorrichtung mit TJ-L.

In der Abbildung 24 sind die Konzepte der Haltevorrichtung und der Anlage zusammengeführt. Dabei ist zu erkennen, dass alle einzelnen Komponenten gut erreichbar für Wartungsarbeiten sind. Ferner ist in dem Anlagengestell trotz kompakter Bauweise ausreichend Platz für die Herstellung des PAW gegeben.



**Abbildung 24:** Anlagenkonzept mit Haltevorrichtung.

Nach der erfolgreichen Konzipierung und Platzierung der Haltevorrichtung im Anlagenkonzept per CAD-Programm, erfolgte die praktische Fertigung im Technikum der HAWK (Labor für Laser- und Plasmatechnologie). Hierbei wurde im ersten Schritt der 1 kW Faserlaser genutzt, um damit die 2mm starken S235JR Stahlbleche auszuschneiden. Danach gelangten die Stahlbleche zum Abkanten. Beim Abkanten ist besonders auf die Winkelgenauigkeit der einzelnen Blechstücke zu achten, da sonst die komplette Haltevorrichtung nicht zusammensetzbar ist. Nach der Überprüfung der Passgenauigkeit wurden die einzelnen Stahlbleche mittels MAG-Schweißverfahren zusammengeschweißt. Die angeschweißte Halteplatte beinhaltet die eigentlichen Aufnahmebohrungen für die Plasmaquelle TJ-L. Somit kann bei späteren Wartungsarbeiten die Plasmaquelle ohne großen Aufwand von der Haltevorrichtung demontiert werden. Nachfolgend erfolgt eine Schutzlackierung der gesamten Haltevorrichtung mit anschließender Schraubmontage auf dem Anlagengrundgestell. Für die Anschraubbarkeit der Haltevorrichtung wurden im Anlagengrundgestell M8-Gewindenieten eingesetzt, da die Stahlprofile mit einer Wandstärke von 3 mm nicht ausreichend Gewindgänge für ein M8 aufnehmen können, siehe Abbildung 25.



**Abbildung 25:** Anlagengrundgestell mit Haltevorrichtung.

Anschließend wurde der Tantec HV-X20 Hochspannungsgenerator auf dem Anlagengrundgestell platziert und installiert, siehe Abbildung 26. Für die richtige Platzierung dient der Labor-Scherentisch, so können jetzt noch Korrekturen durchgeführt werden um den optimalen Arbeitsbereich zu bestimmen. Die Versorgungsleitungen, elektrische und pneumatische Leitungen, sind am Anlagengrundgestell mit Kabelbinder angebracht. So können diese bei Beschädigungen einfach durch entfernen der Kabelbinder ausgetauscht werden.



**Abbildung 26:** Anlagengrundgestell mit Komponenten.

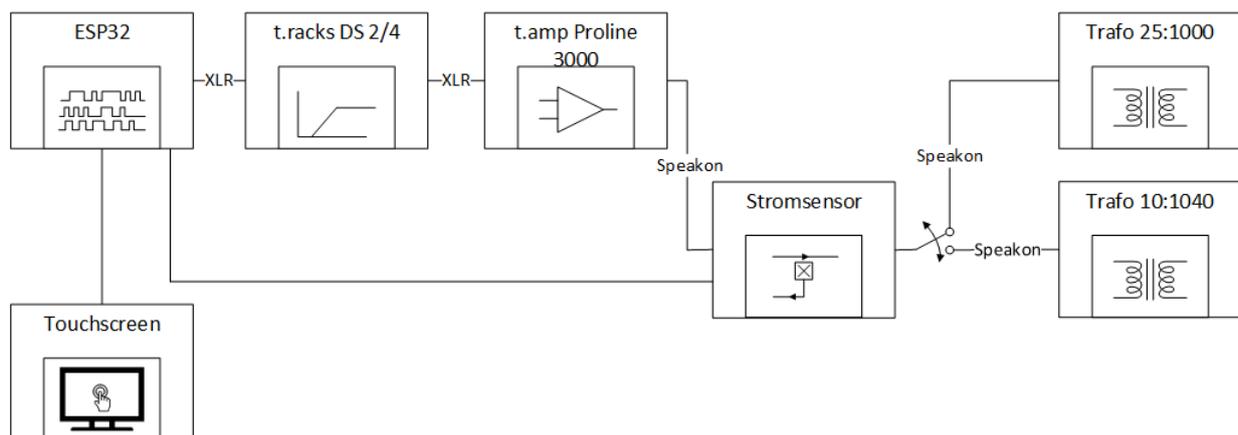
Der Aufbau der hochskalierten Laboranlage zur PAW-Herstellung, musste allerdings in einigen Anlagenkomponenten überarbeitet werden, damit eine einwandfreie Funktion im späteren Praxis-Einsatz im Stall gewährleistet werden kann. Um ein Überhitzen der Plasmaquelle zu vermeiden, wurden an die Haltevorrichtung noch Axiallüfter angebracht, die für die aktive Kühlung der Plasmaquelle mittels Luftstromes dienen. Die für den Betrieb der Axiallüfter benötigte Spannung von 24V wird über ein separates Labornetzgerät bereitgestellt. Das Labornetzgerät ist im vorderen Bereich der Anlage platziert. Ein weiterer essentieller Aspekt ist die Installation eines Stromverteilers mit 1x LS C 16 A, 3-polig und 2x LS C 16 A, 1-polig Absicherung. Zudem besitzt der Stromverteiler neben 4x 230 V Schutzkontakt auch 1x CEE-Steckdosen 400 V, 16 A, 5-polig und 1x CEE-Steckdose 400V, 32 A, 5-polig, sodass alle verbauten elektrischen Verbraucher an den Stromverteiler angeschlossen werden können und über diesen zusätzlich noch mit einem FI-Schutzschalter abgesichert sind, siehe Abbildung 27.



**Abbildung 27:** Installierter Stromverteiler.

Für den praxisnahen Einsatz der Anlage im landwirtschaftlichem Außenbereich, besitzt die Anlage zusätzlich einen separaten Erdungsstab. Dieser Metallstab ist mit dem Anlagengestell gekoppelt. Eingetrieben wird der Erdungsstab in den Erdboden. Somit ist eine zusätzliche Erdung des Anlagengestells gewährt. Nach den erfolgreichen Erweiterungsmaßnahmen wurde die Anlage in Betrieb genommen. Alle Komponenten funktionieren störungsfrei. Somit konnte eine Versuchsreihe gestartet werden zur Ermittlung der Leitwasserwerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$ , im Vergleich zu den Leitwerten von dem Laboraufbau. Hierzu wurde Leitungswasser wurde eine 0,5 molare TRIS-Puffer-Lösung hergestellt und 40 Minuten bei 850 Watt behandelt. Als Prozessgas diente die komprimierte Luft aus dem verbauten Kompressor in der Anlage. Der Luftstrom lag bei 50 l/min. Beim Betreiben der Plasmaquelle in der Anlage hat sich eine Frequenz von 16,3 kHz eingestellt. Die Messergebnisse der Wasserleitwerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$

und  $\text{NO}_3^-$  lagen vom Laboraufbau und Stall-Anlage im selben Bereich. Im Rahmen der Skalierung der Anlage sollte die Hochspannungsversorgung der Anlage von einem flexiblen marktüblichen Gerät zu einer stationären, auf die Plasmaquelle zugeschnittenen Eigenentwicklung ersetzt werden. Durch Einschränkungen in der Flexibilität, im Vergleich zu marktüblichen Geräten, können Beschaffungskosten stark reduziert werden, da auf nicht benötigte Bauelemente verzichtet werden kann. Dazu wurden als Basis Komponenten aus der Beschallungstechnik verwendet, da diese bereits serienreife besitzen und entsprechend günstig gefertigt werden können. Ebenso sind Leistungsendstufen aus der Beschallungstechnik bereits für induktive Lasten, wie es bei Transformatoren der Fall ist, ausgelegt und bereits mit vielen Schutzschaltungen versehen. Es konnten mit der Eigenentwicklung im Vergleich zum verwendeten Tantec-Netzgerät zwar Plasmaleistungen in der gleichen Größenordnung, jedoch nicht mit dem Zielwert des Tantec-Netzgerätes erreicht werden. Hierbei besteht noch Optimierungsbedarf bei der Auslegung des Transformators. Bei der Eigenentwicklung (Abbildung 28 und 29) wird ein ESP32 Mikrocontroller als Signalerzeuger verwendet. Ebenso steuert er ein Touchscreen an, welches als User-Interface verwendet wird. Der t.racks DS 2/4 ist ein digitaler Filter, welcher als einer von zwei Schutzeinrichtungen verwendet werden sollte. Der t.racks DS 2/4 ist als Hochpass konfiguriert, sodass niedrige Frequenzen unter 10 kHz gefiltert werden, denn bei niedrigeren Frequenzen fließen sonst höhere Ströme auf der Primärseite des Transformators, sodass der Audioverstärker (t.amp Proline 3000) überlastet werden würde. Ein Stromsensor misst den Primärstrom ebenfalls und wird vom ESP32 ausgelesen und verarbeitet, sodass eine automatische Abschaltung bei Überstrom implementiert werden konnte.



**Abbildung 28:** Prinzipskizze der Eigenkonstruktion des Hochspannungsgenerators.

Es stellte sich heraus, dass der Stromsensor als Schutzvorrichtung ausreichte, sodass der t.racks DS 2/4 überbrückt werden konnte. Zusätzlich filtert der t.racks DS 2/4 neben den tiefen Frequenzen auch ungewollt hohe Frequenzen  $> \text{ca. } 22 \text{ kHz}$ , sodass dies zu einer ungewollten Begrenzung führte. Zur Hochspannungstransformation wurden drei Wicklungsverhältnisse getestet (10:1040, 25:800, 25:1000), wobei sich das Wicklungsverhältnis 10:1040 als bestes herausgestellt hatte und 25:800 als schlechtestes. Das Wicklungsverhältnis 25:800 wurde

deshalb auch nicht im Gerät verbaut. Über zwei Unterschiedliche Anschlüsse am Trafogehäuse kann zwischen den Trafos manuell gewechselt werden. Um den Zielwert in der Plasmaleistung zu erreichen, muss vermutlich das Wicklungsverhältnis und der Trafokern optimiert werden, da der Trafokern in Sättigung geht und dadurch die Leistung teilweise ineffizient transformiert wird.



**Abbildung 29:** Plasmaentladung beim Wicklungsverhältnis 10:104 (links), graphisches User-Interface (mitte), Eigenkonstruktion HV-Generator mit Beschallungstechnikkomponenten (rechts).

Dennoch ist festzustellen, dass durch die entsprechende Eigenentwicklung nicht nur die Effizienz gesteigert werden könnte, sondern auch die finanziellen Belastungen für Nutzer wie Landwirte verringern, da die finanziellen Aufwendungen für die Teilkomponenten geringer sind als für die bisher eingesetzten auf dem Markt erhältlichen Netzgeräte. Ggf. können sogar mehrere Transformatoren mit einem Audioverstärker gleichzeitig betrieben werden, sodass die Gerätekosten zusätzlich reduziert werden, wenn mehrere Plasmaquellen parallel eingesetzt werden müssen. In Abbildung 30 ist die endgültige Konfiguration der Anlage für den robusten Einsatz unter Realbedingungen mit 2 Plasma-Röhren und dem Tantec-Versorger (ohne Spritzschutz) dargestellt.



**Abbildung 30:** „Aqua-Jet“ mit 2 Plasma-Röhren und dem Tantec-HVX-Versorger.

Charakterisierung der Anlage bzgl. ihrer elektrischen Kennwerte (U-I-Charakteristik, eingekoppelte Leistung), plasmadiagnostischen/spektroskopischen Parameter (Elektronenenergie etc.) und des damit produzierten PAW hinsichtlich der mikrobiologischen Aktivität.

### Elektrotechnische Kennwerte

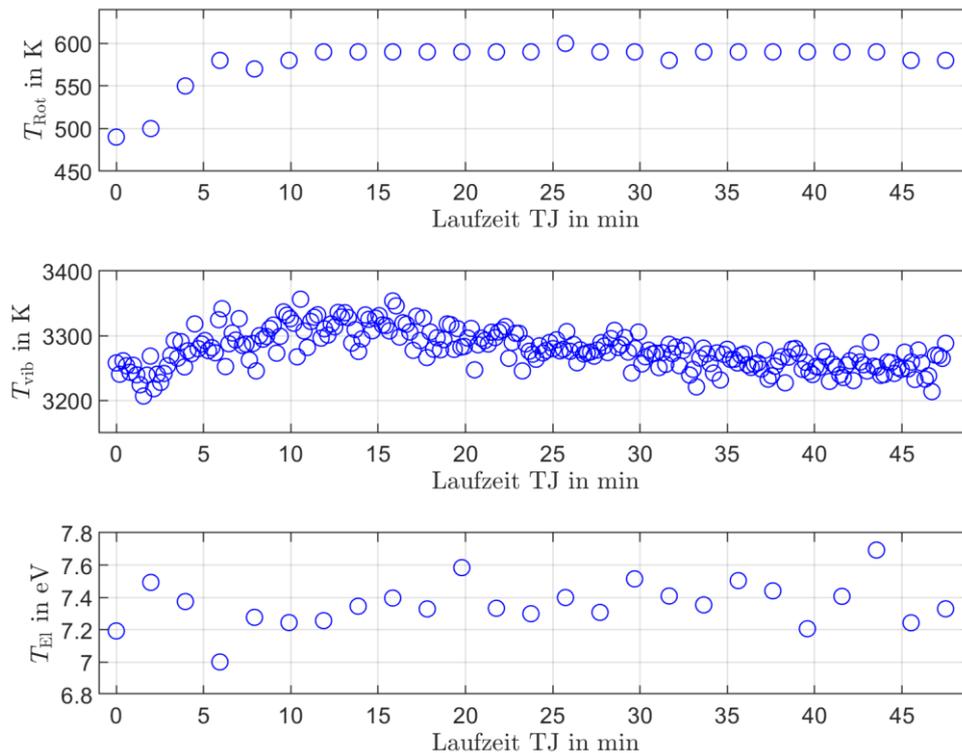
Bei der Messung der Strom- und Spannungsverläufe und den daraus bestimmbar in das Plasmavolumen eingekoppelten Leistung (Abbildung 31 zeigt exemplarisch die Verläufe und die Leistung bei 850 W Nennleistung) konnte festgestellt werden, dass die vom Tantec-Versorgungsgerät angezeigte Nennleistung eine Abweichung von ca. 5% aufweist.



**Abbildung 31:** U-I-Charakteristik bei 850W Ausgangsleistung des Tantec-HV-X20.

### Spektroskopische Charakterisierung

Durch die Auswertung spektralanalytischer Messungen mittels Echelle-Spektrometrie zur Elektronentemperatur konnte ein stabiler Betrieb der Plasmaquelle bestätigt werden. Durch Bestimmung der Intensität und Bandenlage wurde die Elektronentemperatur zu durchschnittlich 7,3 eV im Plasmavolumen bestimmt, während die Vibrationstemperatur bei ca. 3300 K und die Rotationstemperatur bei ca. 600 K liegt (siehe Abbildung 32). Anhand der Rotationstemperatur konnte die Zeit bis zu einem stationären Betrieb der Anlage zu ca. 5 min bestimmt werden, d.h. dass sich hier eine Handlungsempfehlung für einen gesicherten stabilen Betrieb der Anlage von einem etwa 10-minütigem „Warmlaufen“ ergibt.



**Abbildung 32:** Elektronentemperatur, Vibrationstemperatur und Rotationstemperatur bei Betrieb der Anlage mit 850 W Nennleistung.

#### Mikrobizide Eigenschaften des (Tb)PAW

Um die bakterizide Wirkung des mithilfe der Anlage produzierten Tb-PAW abzuschätzen wurde *Bacillus atropheus* als Standardkontaminationsmikroorganismus verwendet. Eine *Bacillus atropheus*-Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Bakterien gezählt und in PBS resuspendiert, um eine Stammlösung mit einer Konzentration von  $10^9$  Bakterien/ml herzustellen. In unserem Versuchsplan war das endgültige getestete Bakterienpräparat, das für die PAW-basierte Desinfektion verwendet werden sollte, eine Bakterienmischung, die in Tris-HCL-Puffer (Kontrolle) und auch Tris-HCL (plasmabehandelt) resuspendiert wurde. Wir führten auch serielle Verdünnungen durch, die aus  $10^7$ ,  $10^5$  und  $10^3$  Bakterien/ml bestanden. Die Inkubationszeit der Bakterienmischung in Tris HCL (Kontrolle) oder Tris HCL (Plasma) betrug 30 Minuten. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  jeder repräsentativen Lösung auf Agar-Petrischalen aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt und die statistische Signifikanz mit Hilfe eines Student-T-Tests ermittelt. Im folgenden ist der allgemeine Ablauf der Versuchsdurchführung dargestellt:

Schritt 1



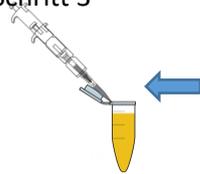
Inkubation des *B. atrophaeus*-Stammes über Nacht bei 37 °C.

Schritt 2



Herstellung einer Stammlösung ( $10^9$  Bakterien/ml) in PBS.

Schritt 3



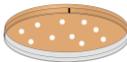
Serielle Verdünnungen von  $10^7$ ,  $10^5$  und  $10^3$ , entweder mit PAW behandelt oder als Kontrolle (30 Minuten inkubiert).

Schritt 4



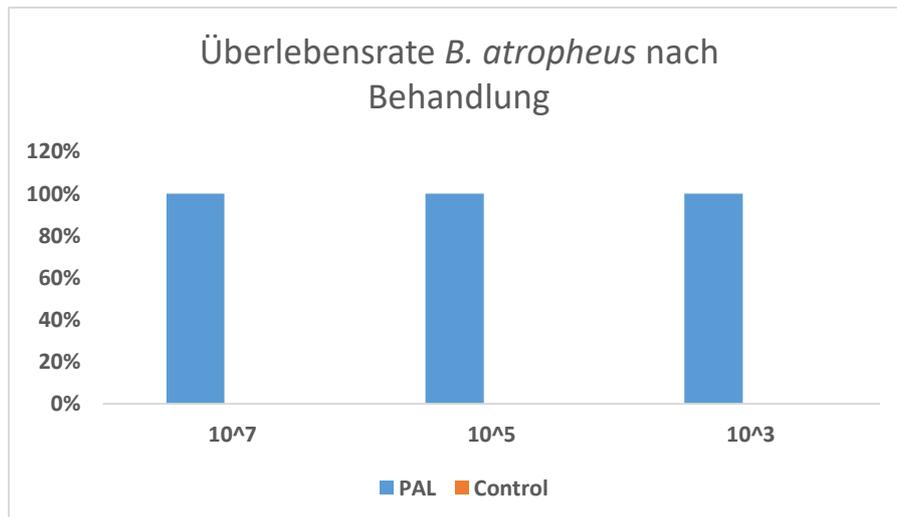
200  $\mu$ l jeder Bakterienverdünnung wurden auf Agar-Petrischalen aufgebracht und bei 37°C inkubiert.

Schritt 5



CFU-Zählung und statistische Analysen wurden durchgeführt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Überlebensrate der *B. atrophaeus*-Bakterien nach der Inkubation in Tb-PAW signifikant reduziert war, 100 % der Bakterien wurden im Vergleich zur Kontrolle abgetötet (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Überlebensrate von *B. atropheus* bei 3 verschiedenen Verdünnungen.

Des Weiteren ist geplant zur Charakterisierung der Anlage weitere Daten über den Abschluss des Projektes hinaus zu erheben und diese zusammen mit den bereits vorhandenden Ergebnissen zu publizieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit der endgültigen Konfiguration der Anlage (Abbildung 30) ein Gerät zur Verfügung steht, welches sowohl in plasmatechnischer Hinsicht als auch hinsichtlich der mikrobiologischen Eigenschaften des damit produzierten (Tb)PAW die geforderten Kriterien erfüllt. Damit steht ein Demonstrator für die geplanten Verwertungen – z.B. im Rahmen weiterer Drittmittelprojekte und/oder Kooperationen mit landwirtschaftlichen Unternehmen und wissenschaftlichen Institutionen - zur Verfügung.

#### 2.4.3.4. Arbeitspaket B1 „Auswahl der Mikroorganismen und Versuche mit Reinkulturen“

##### 2.4.3.4.1. „Auswahl der Mikroorganismen und Protokollerstellung zur Herstellung von Reinkulturen“

Für das Projekt wurden von den mit *DD*- assoziierten Mikroorganismen die beiden Keime *F. necrophorum* und *P. levii*, zusätzlich zu den bereits im Projektantrag vorgesehenen drei Bakterien-Spezies *E. coli*, *S. aureus* und *C. sporogenes* ausgewählt. Tabelle 2 bietet eine Übersicht zur Auswahl der genannten Bakterien.

**Tabelle 2:** Im Projekt verwendete Mikroorganismen und Auswahlkriterien

Mikroorganismen	Begründung der Auswahl
<b><i>Fusobacterium necrophorum</i></b>	assoziiert mit <i>Dermatitis digitalis</i> - Läsionen, Nachweis beschrieben
<b><i>Porphyromonas levii</i></b>	assoziiert mit <i>Dermatitis digitalis</i> - Läsionen, Nachweis beschrieben
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Indikatorkeim für fäkale Kontaminationen
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Indikatorkeim für pathogene Mikroorganismen
<b><i>Clostridium spp.</i></b>	Indikatorkeim für anaerobe Mikroorganismen

Nach Auswahl der fünf Mikroorganismen wurden sowohl die bereits etablierten Anzuchtprotokolle der drei Indikatorbakterien *E. coli*, *S. aureus* und *C. sporogenes* überprüft, als auch Anzuchtversuche mit den beiden ausgewählten *DD*- Erregern durchgeführt. Dieses geschah anhand von Kulturversuchen, die sowohl mittels Blutplatten als auch zum Teil auf Selektivplatten unter definierten Wachstumsbedingungen durchgeführt wurden. Ein Überblick über die Anzuchtbedingungen der drei Indikatorbakterien gibt Tabelle 3. Das Wachstum dieser Bakterienspezies auf den angewendeten Nährböden wird in den Abbildungen 34 - 36 dargestellt.

**Tabelle 3:** Anzuchtbedingungen der drei Indikatorbakterien

Mikroorganismen	Nährboden / Selektivnährboden	Wachstumsbedingungen
<i>Escherichia coli</i>	Columbia- Blutagar mit Schafblut <b>Selektivnährboden:</b> Colic Brilliance™ <i>E. coli</i> /Coliform- Selektivagar	Inkubation: 24h Temperatur: 30 - 37 °C Sauerstofftoleranz: aerob
<i>Staphylococcus aureus</i>	Columbia- Blutagar mit Schafblut <b>Selektivnährboden:</b> Baird-Parker-Agar	Inkubation: 24 - 48h Temperatur: 30 - 37 °C Sauerstofftoleranz: aerob

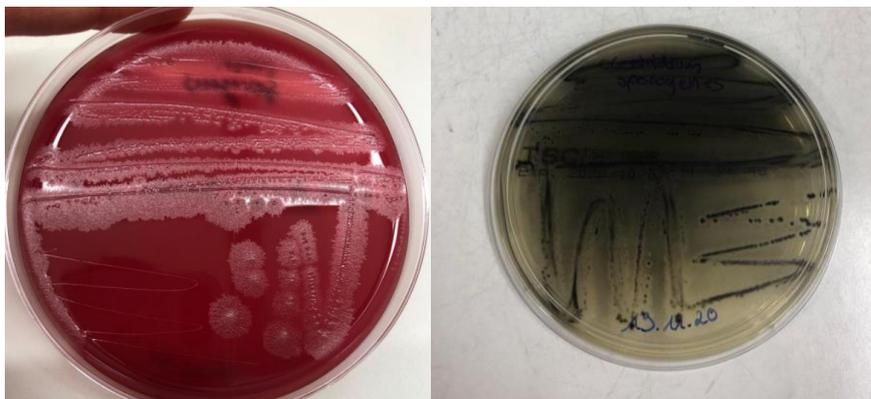
<i>Clostridium sporogenes</i>	Columbia- Blutagar mit Schafblut <b>Selektivnährboden:</b> Tryptose Cycloserine Agar (TSC)	Inkubation: 48 - 72h Temperatur: 37 °C Sauerstofftoleranz: anaerob
-------------------------------	--	---



**Abbildung 34:** Anzucht von *Escherichia coli*: links auf Columbia- Blutagar; rechts auf Colic Brilliance™



**Abbildung 35:** Anzucht von *Staphylococcus aureus*: links auf Columbia- Blutagar; rechts auf Baird-Parker-Agar.



**Abbildung 36:** Anzucht von *Clostridium sporogenes*: links auf Columbia- Blutagar; rechts auf Tryptose Cycloserine Agar (TSC).

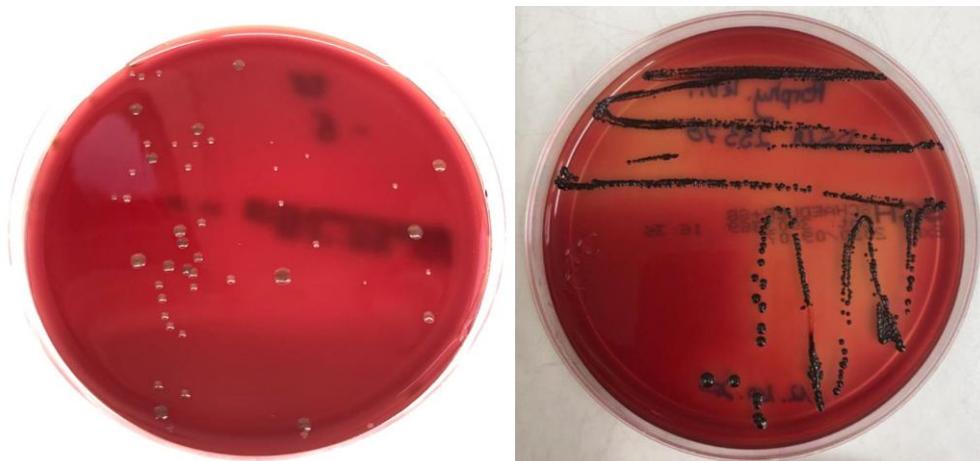
Des Weiteren werden in Tabelle 4 die Anzuchtbedingungen der beiden *Dermatitis digitalis*-Erreger aufgeführt, sowie in den Abbildungen 37 und 38 das Wachstum dieser Bakterienspezies auf Schaedler Anaerobes Agar mit Schafblut, Haemin & Vitamin K 1 dargestellt.

**Tabelle 4:** Anzuchtbedingungen von *Fusobacterium necrophorum* und *Porphyromonas levii*

Mikroorganismen	Nährboden / Selektivnährboden	Wachstumsbedingungen
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Schaedler Anaerobes Agar mit Schafblut, Haemin & Vitamin K 1	Inkubation: 72h Temperatur: 37 °C Sauerstofftoleranz: anaerob
<i>Porphyromonas levii</i>	Schaedler Anaerobes Agar mit Schafblut, Haemin & Vitamin K 1	Inkubation: 24 - 48 h Temperatur: 37 °C Sauerstofftoleranz: anaerob



**Abbildung 37:** Anzucht von *Fusobacterium necrophorum* auf Schaedler Anaerobes Agar mit deutlicher  $\beta$ -Hämolyse.



**Abbildung 38:** Anzucht von *Porphyromonas levii* auf Schaedler Anaerobes Agar: links nach 48h Inkubation; rechts nach 72h.

#### 2.4.3.4.2. „Plasmawasserversuche mit Reinkulturen“

Ab dem 21. September 2020 wurde mit den Tb-PAW- Versuchen begonnen. Nach Absprache zwischen den Projektpartnern HAWK und LMQS wurde sich darauf geeinigt, einen TRIS-Puffer für die Tb-PAW- Versuche einzusetzen, da sich mit nicht-gepuffertem Trinkwasser eine deutliche pH- Wert- Absenkung bis auf pH- Werte von 2 - 3 gezeigt hat. Aufgrund der Zielvorgabe, die Substanz am Tier auf der Haut anzuwenden, wurde sich auf einen neutralen Ziel-pH-Wert des Tb-PAWs geeinigt. Ein nicht ganz trivialer Aspekt dieser Entscheidung ist auch, dass die Reduktion der Mikroorganismen durch die reaktiven Spezies des Tb-PAWs erzielt werden sollen und nicht etwa Folge eines pH-Effektes abbilden sollten. Nach jeder Plasmawasserherstellung wurde der pH- Wert mittels pH- Meter (Jenway, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, ST15 OSA, UK) bestimmt, sowie die Nitrit- /Nitrat- Werte und die Wasserstoffperoxidkonzentration (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mittels Refraktometer bzw. über Teststreifen festgestellt. Es wurden zu Beginn verschiedene Plasmawassergeräte eingesetzt und die Wirkung der einzelnen Tb-PAWs untersucht. Dabei wurden vorerst nur die Bakterienpezies *E. coli* und *S. aureus* mit einer Einwirkzeit von 15 min getestet. Die erfolversprechendsten Ergebnisse wurden hierbei mit dem EA (Tabelle 5; Geräteversion 5) erzielt, sodass alle nachfolgenden Versuche mit diesem Gerät durchgeführt wurden.

**Tabelle 5:** Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Plasmawassergeräten

Plasma- wasser- gerät (Version)	Bakterien- spezies	Einwirk- zeit in min	Reduktion in log <sub>10</sub> Kolonie bildende Einheit (KbE)/ml	Spezifikationen des Plasmawassers			
				pH- Wert	Nitrat (mg/ l)	Nitrit (mg/ l)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/ l)
1	<i>E. coli</i>	15	0	8,5	k. A.	k. A.	k. A.
2	<i>E. coli</i>	30	0	8,5	64	1,6	9,6
3	<i>E. coli</i>	15	0	8,5	450	40	30
	<i>S. aureus</i>		0				
4	<i>E. coli</i>	15	0	8,5	342	21,6	21,3
	<i>S. aureus</i>		0				
5	<i>E. coli</i>	15	0	8,5	950	48	1,1
	<i>S. aureus</i>		1				
6	<i>E. coli</i>	15	0	8,5	770	23,5	2,1

Anschließend wurde der pH-Wert des Tb-PAWs angepasst und eine optimale Laufzeit bestimmt wurde (Tabellen 6 und 7). Aus den Versuchen ergaben sich die besten Ergebnisse nach einer Laufzeit von 20 min bei Verwendung eines 0,5 molarigen TRIS-Puffers mit pH 7,5.

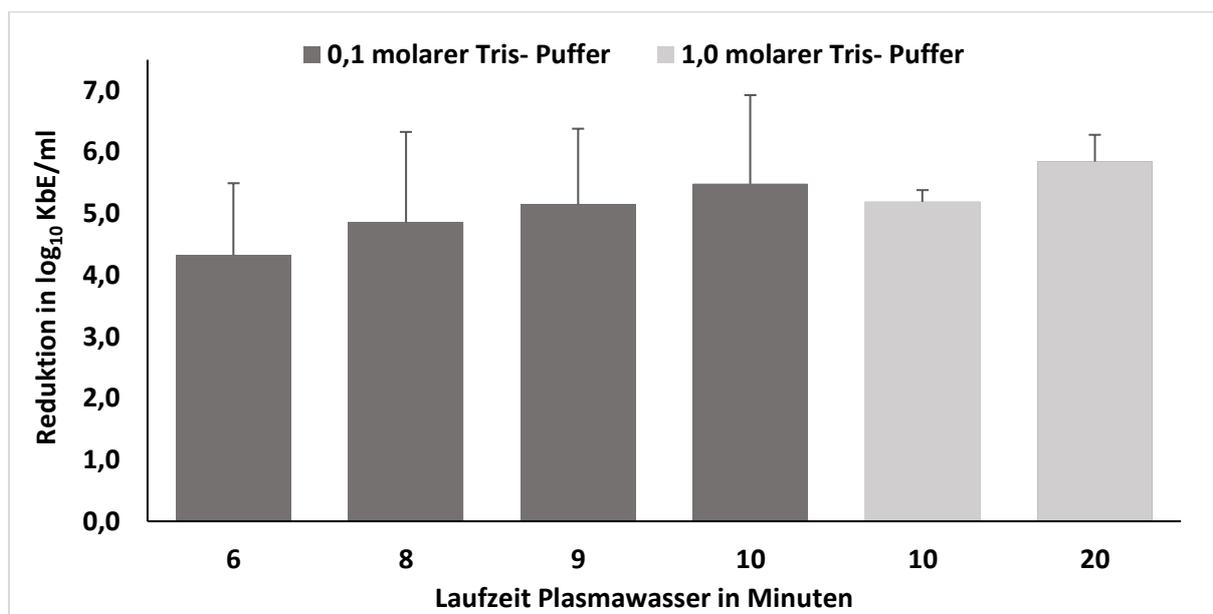
**Tabelle 6:** Darstellung der verschiedenen pH- Werte des TRIS-Puffers und die Wirkungen des produzierten Plasmawassers mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

Bakterien-spezies	Einwirkzeit in min	Reduktion in log <sub>10</sub> KbE/ml	pH- Wert TRIS-Puffer	pH- Wert Plasma-wasser	Nitrat (mg/ l)	Nitrit (mg/ l)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/ l)
<i>E. coli</i>	15	4	7,5	7,08	1400	66	12,3
<i>E. coli</i>	15	4	8,0	7,77	1320	68	3,5
<i>E. coli</i>	15	1	8,5	8,34	1220	62	2,3

**Tabelle 7:** Anwendung verschiedener Laufzeiten zur Plasmawasserherstellung und deren Ergebnisse mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

Bakterien-spezies	Einwirk-zeit in min	Laufzeit zur Herstellung in min	Reduktion in log <sub>10</sub> KbE/ml	pH- Wert TRIS-Puffer	pH- Wert Plasma-wasser	Nitrat (mg/ l)	Nitrit (mg/ l)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/ l)
<i>E. coli</i>	15	4	1	7,5	7,41	510	32,0	3,0
<i>E. coli</i>	15	6	4	7,5	7,15	910	50,0	10,2
<i>E. coli</i>	15	8	2	7,5	6,90	1180	71,0	15,2
<i>E. coli</i>	15	9	4	7,5	6,67	1390	82,0	15,9
<i>E. coli</i>	15	10	3	7,5	6,13	1440	68,0	19,6

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe deuten auf einen Einfluss der Laufzeit auf die keimabtötende Wirkung des Tb-PAWs hin und wurden im weiteren Projektverlauf näher betrachtet. Da infolge einer längeren Behandlung des TRIS-Puffers mehr reaktive Spezies entstehen dürften, zeigte sich erneut ein zunehmend stärkerer Abfall des pH-Wertes. Aus diesem Grund wurde die Molarität des eingesetzten TRIS-Puffers so variiert, dass die Laufzeit erhöht und der Ziel-pH-Wert erhalten werden konnte. Im Zuge dieser Versuchsreihe wurde die Einwirkzeit des Tb-PAWs von 15 min auf 1 min reduziert, um eine praxisnahe Anwendung im Hinblick auf die späteren Versuche am Tier zu simulieren. Der pH-Wert des TRIS-Puffers wurde für alle weiteren Versuchsreihen auf 7,5 eingestellt. Anhand der Reduktion von *E. coli* wurde der Einfluss der Laufzeit auf die Plasmawasserwirkung analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 und Tabelle 8 dargelegt. Wie man in Abbildung 39 sehen kann, verbessert sich die Reduktion von *E. coli* mit verlängerter Laufzeit des Plasmawassergerätes.

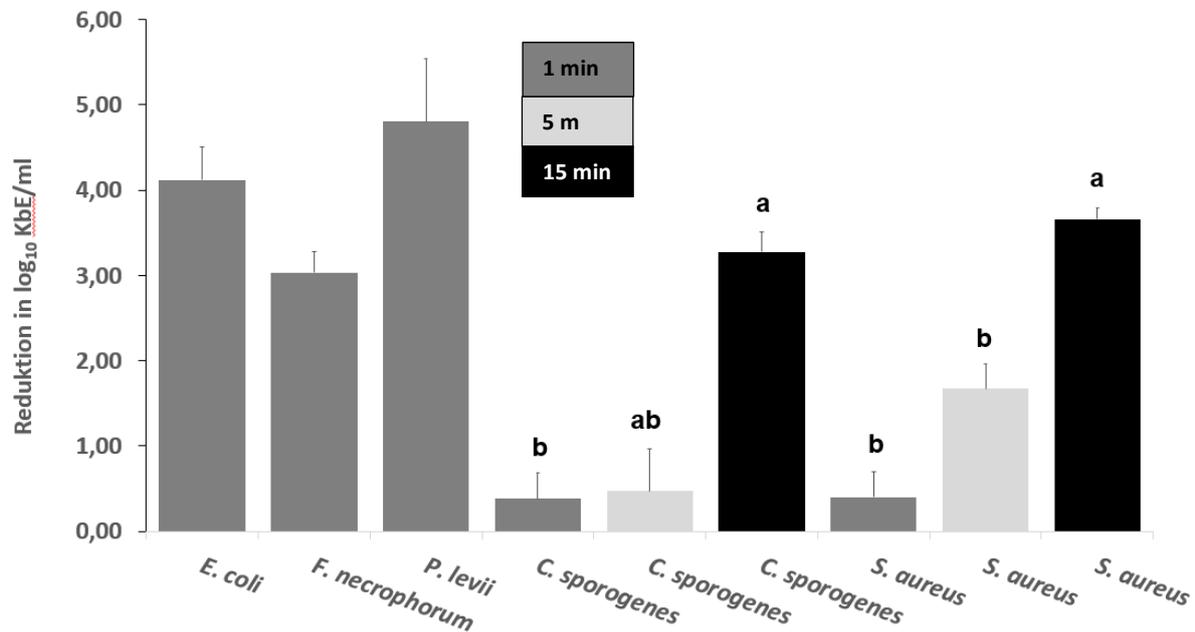


**Abbildung 39:** Reduktion von *Escherichia coli* in Abhängigkeit verschiedener Laufzeiten des Plasmawassers bei einer Einwirkzeit von 15 min ( $n \geq 2$ ).

**Tabelle 8:** Reduktion von *Escherichia coli* nach Anwendung verschiedener Laufzeiten und Molaritäten des TRIS-Puffers ( $n=1$ )

Molarität des TRIS-Puffers	Laufzeit in min	Einwirkzeit in min	Reduktion in log <sub>10</sub> KbE/ml
0,3	20	1	6,34
0,4	20	1	5,97
0,5	20	1	6,77
0,4	30	1	5,97
0,5	40	1	6,07

Ab dem 06. Mai 2021 konnte das Tb-PAW auf die Keime *S. aureus*, *Cl. sporogenes*, *F. necrophorum* und *P. levii* angewendet werden. Im Verlauf der Versuche konnte festgestellt werden, dass die Keimgehalte von *E. coli* sowie der mit *DD*-assoziierten Keime *F. necrophorum* und *P. levii* durch das Tb-PAW um bis zu 4,12 bzw. bis 3,04 und 4,80  $\log_{10}$  KbE/ml reduziert wurden (Abbildung 40). Im Gegensatz dazu wurden die Keimgehalte von *C. sporogenes* und *S. aureus* nach einer ein- bzw. fünfminütigen Einwirkzeit kaum reduziert, sodass hier die Vermutung besteht, dass diese Bakterienspezies nicht im gleichen Maße wie die anderen untersuchten Bakterienspezies durch das Tb-PAW beeinflusst wird.

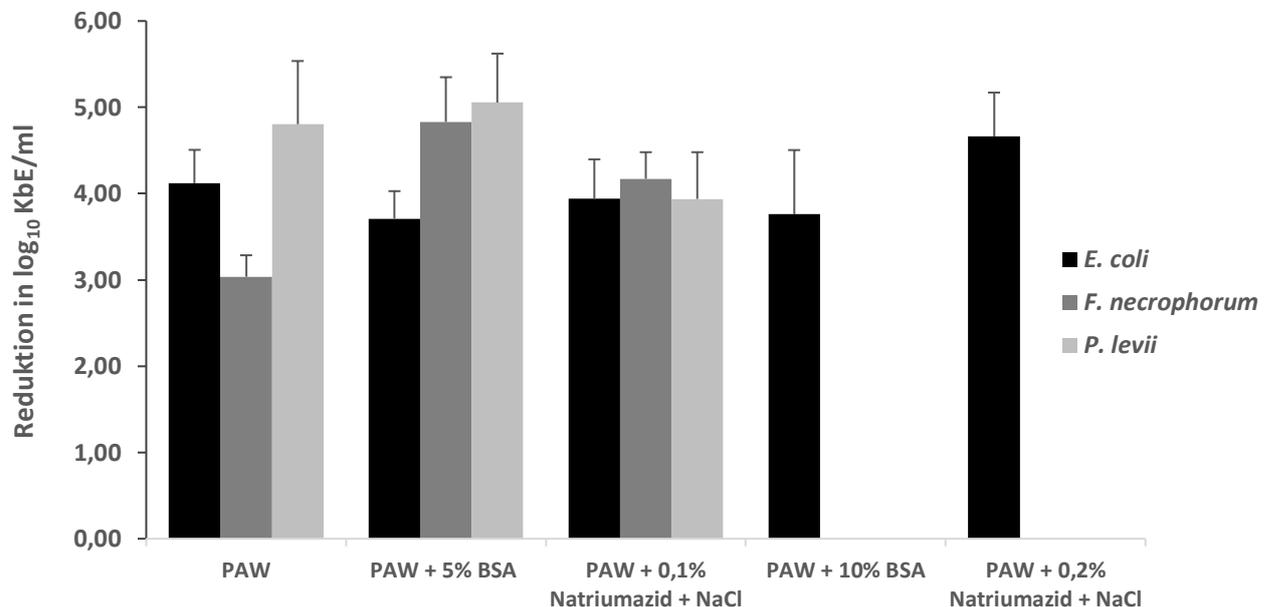


**Abbildung 40:** Inaktivierung von *Escherichia (E.) coli*, *Staphylococcus (S.) aureus*, *Fusobacterium (F.) necrophorum*, *Porphyromonas (P.) levii* und *Clostridium (C.) sporogenes* nach 1 min, 5 min und 15 min Tb-PAW-Behandlung. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dar. <sup>ab</sup> Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben weisen auf eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Reduktion hin.

#### Versuchsreihe „Anwendung eines artifiziell zugesetzten Störfaktors“

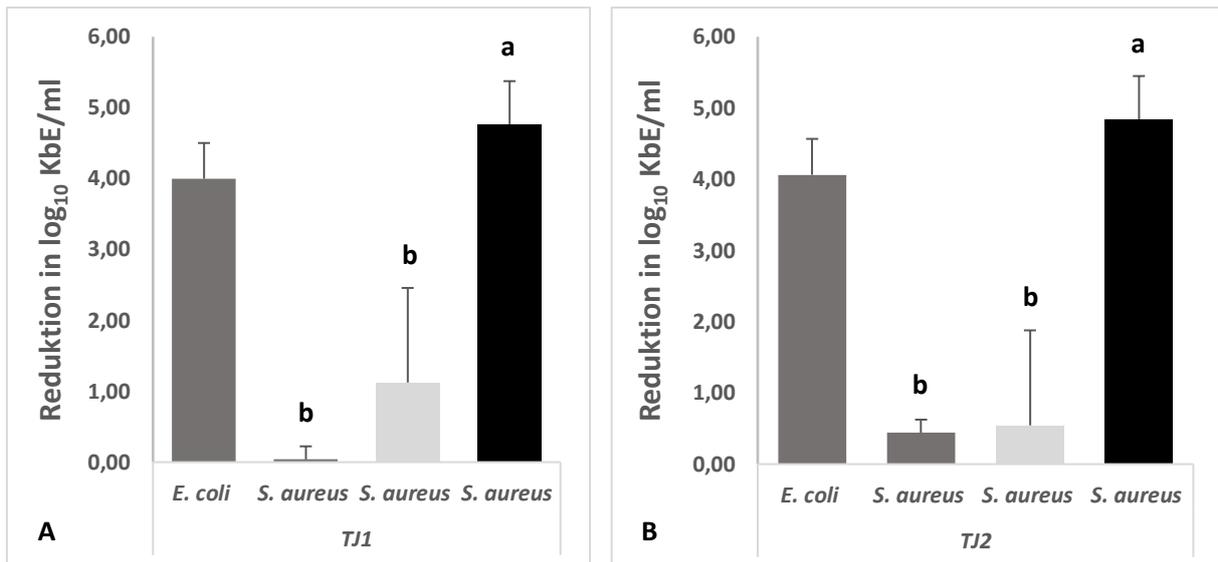
Um die Auswirkungen eines Störfaktors (Schmutz am Tier/im Stall, Proteine auf der Haut des Tieres) zu simulieren, wurde Bovines Serumalbumin (BSA) eingesetzt. Diese Versuchsreihe wurde mit den Bakterienspezies *E. coli*, *F. necrophorum* und *P. levii* näher untersucht. Alle drei Bakterienspezies wurden jeweils mit einer 5%igen BSA-Lösung im Reagenzglas vorgelegt und das Tb-PAW im Anschluss zugegeben. Bei *E. coli* wurde zudem 10% BSA verwendet, um auch einen Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Konzentrationen des Proteins zu untersuchen. Die Einwirkzeit betrug entsprechend der vorhergehenden Reduktionsversuche bei allen drei Keimen eine Minute. Da die verwendete BSA-Lösung nicht ohne Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), welches selbst eine mikrobizide Wirkung aufweist, erhältlich war, wurde als Kontrolle

eine Kombination aus NaCl + 0,1% bzw. 0,2% NaN<sub>3</sub> (für 5% bzw. 10%-BSA) und Tb-PAW angewendet. Als Negativkontrolle wurde das Tb-PAW durch den zu dessen Herstellung verwendeten TRIS-Puffer ersetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt. Die Daten zeigen, dass es bei keinem der drei verwendeten Keime zu signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungsvarianten gekommen ist. Daraus kann abgeleitet werden, dass Proteine (in der angewandten Konzentration) die keimreduzierende Wirkung des Tb-PAWs nicht negativ beeinflussen.



**Abbildung 41:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Keimreduktionen in Abhängigkeit der Behandlungsvariante bei einminütiger Einwirkzeit des Plasmawassers (Tb-PAW) (n=3); BSA = Bovines Serumalbumin.

Zur Evaluierung der Versuchs-Großanlage wurden zwei Varianten des TJ-Tb-PAWs (TJ 1 & TJ 2) untersucht. Die Versuche wurden mit *E. coli* und *S. aureus* als gramnegatives, bzw. grampositives Bakterium durchgeführt. *E. coli* fungierte hier als Standard-Vergleichskeim, der bereits eine gute Reduktion bei Verwendung des EA-Tb-PAWs zeigte. *S. aureus* wurde ausgewählt, da durch das EA-Tb-PAW nur bei längerer Einwirkzeit eine Reduktion erzielt wurde. Für *S. aureus* wurden erneut die Einwirkzeiten 1, 5 und 15 min gewählt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 42 dargestellt. Vergleicht man die Reduktionen von *E. coli* bei Verwendung des EA-Tb-PAWs und TJ-Tb-PAWs, konnte kein signifikanter Unterschied der Reduktionen (bis zu 4,00 log<sub>10</sub> KbE/ml in einer Minute) festgestellt werden. *S. aureus* hingegen wurde durch das TJ-Tb-PAW nach 1 min und 5 min weniger deutlich reduziert (0,04 log<sub>10</sub> KbE/ml & 0,44 log<sub>10</sub> KbE/ml, 1,12 log<sub>10</sub> KbE/ml & 0,54 log<sub>10</sub> KbE/ml). Erst die 15-minütige Einwirkzeit erbrachte bei beiden Geräte-Versionen signifikant höhere Reduktionen, allerdings waren die log-Reduktionen nach 15 min beim EA-Tb-PAW zwar tendenziell höher, jedoch im Vergleich zum TJ-Tb-PAW statistisch nicht signifikant (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 42:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Keimreduktionen in Abhängigkeit der Einwirkzeit (EZ) des Plasmawassers (Tb-PAW, n=3) für TJ1 (A) und TJ2 (B)

EZ= ■ 1 Minute □ 5 Minuten ■ 15 Minuten.

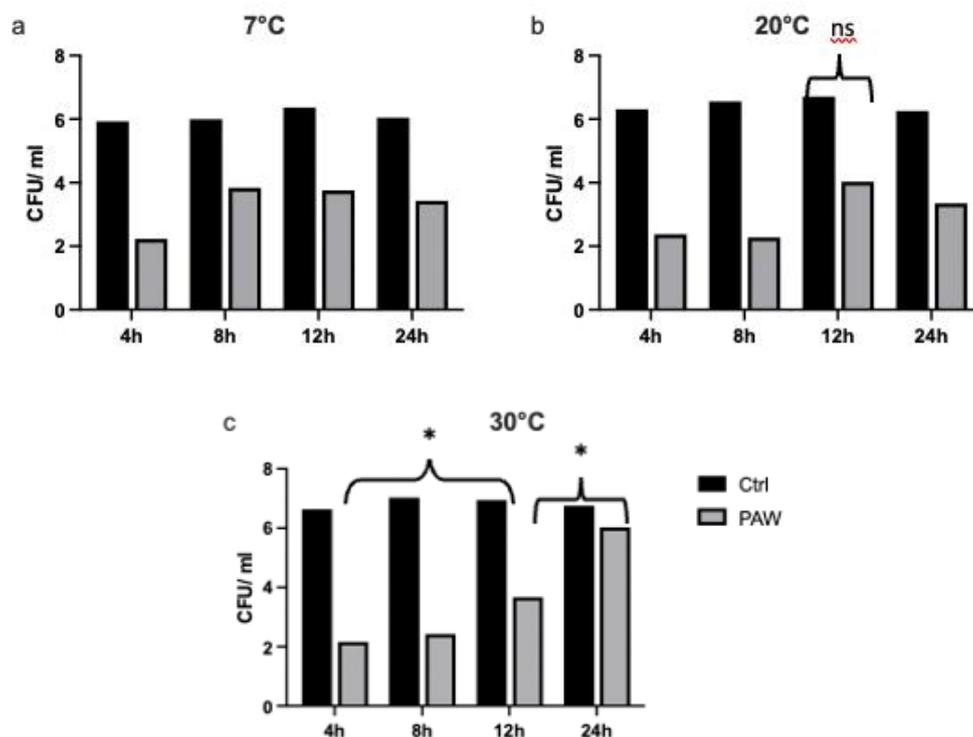
<sup>ab</sup> Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben weisen auf eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Reduktion hin.

#### Versuchsreihe „Lagerzeit und -temperatur des Tb-PAWs und deren Einfluss auf die keimreduzierenden Eigenschaften“

Bei dieser Versuchsreihe wurde die Tb-PAW-Wirkung nach 4, 8, 12 und 24 Stunden überprüft. Zusätzlich wurde das Tb-PAW auf Temperaturen von 30° C, 7° C und 20° C eingestellt, um die Anwendung des Tb-PAWs im Sommer, im Winter und bei Raumtemperatur zu simulieren und einen möglichen Temperatureinfluss zu beurteilen. Für den Versuch wurden 9 ml Tb-PAW in 12 sterile Reagenzgläser gegeben. Vier Proben wurden in einem 30° C warmen Inkubator gelagert. Weitere vier Proben wurden im Kühlschrank bei 7° C und die übrigen Proben bei Raumtemperatur in einem Schrank gelagert. Alle Proben wurden im Dunkeln aufbewahrt. Unmittelbar vor den Messpunkten wurde die Keimzahl von *E. coli* mit Hilfe des McFarland-Trübungsstandards auf  $10^7$  -  $10^8$  KBE/ ml eingestellt. Von jeder Gruppe wurde ein Reagenzglas mit Tb-PAW entnommen und 1 ml der Bakteriensuspension hinzugefügt, gemischt und 1 min lang inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Nach dem Ausbringen von 100 µl auf selektive Agarplatten wurden alle Proben 24 h lang bebrütet. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Reagenzgläsern mit 9 ml TRIS-Puffer gefüllt und wie beschrieben behandelt.

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse zu diesem Versuch dargestellt. Der Vergleich zwischen den TRIS-Kontrollen und den entsprechenden Tb-PAW- Proben zeigte bei fast allen Temperaturen und Lagerzeiten signifikante Reduktionen. Diese reichten von 4,60 log-Stufen (30° C, 8 h) bis 0,73 log-Stufen (30° C, 24 h). Die einzige Ausnahme bildet die Tb-PAW- Probe bei 20° C und 12

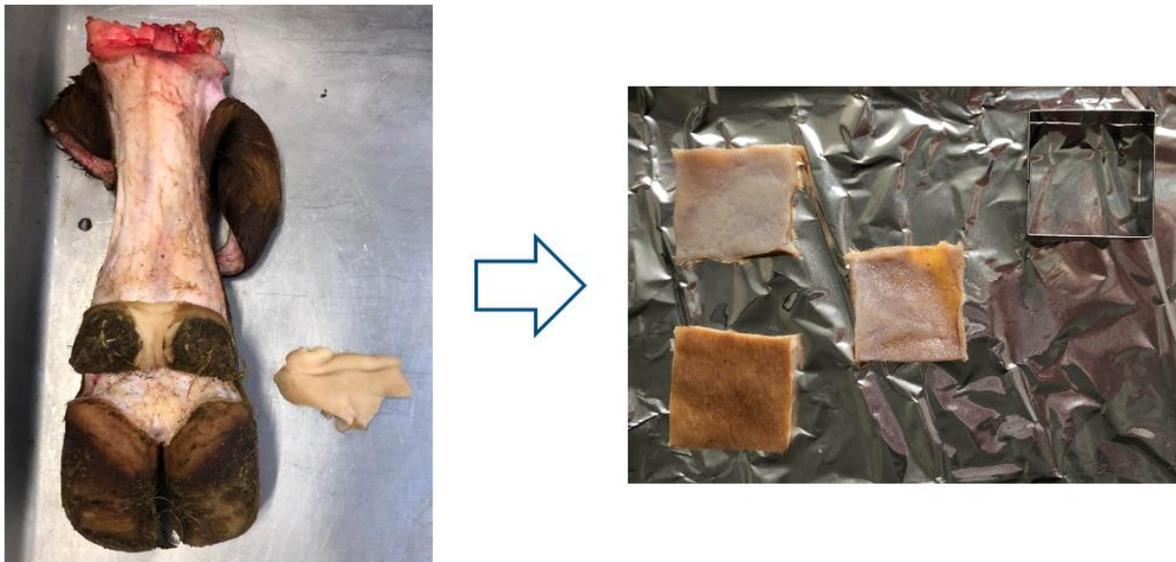
h, bei der die Keimreduktion von 2,91 log-Stufen nicht signifikant unterschiedlich zur TRIS-Kontrolle war. Vergleicht man die bei den verschiedenen Temperaturen gelagerten Proben an den jeweiligen Analysezeitpunkten, so gibt es hier keinen signifikanten Unterschied in der Wirkung des Tb-PAWs zwischen den verschiedenen Lagertemperaturen zum jeweilig betrachteten Beprobungszeitpunkt. Allerdings führte das Tb-PAW bei 30° C nach 24 h-Lagerung insgesamt zu der geringsten absoluten Reduktion während der Versuchsreihen. Betrachtet man nur die 30° C- Proben über den gesamten Lagerungszeitraum, so konnte nach 24 h eine signifikant schlechtere Wirkung des Tb-PAWs im Vergleich zu den 4 h bzw. 8 h-Proben, nicht jedoch gegenüber der Analyse zum Zeitpunkt 12 h festgestellt werden. Als Beobachtung und eine damit verbundene Anwendungsempfehlung kann somit abgeleitet werden, dass sich die bakterizide Wirksamkeit des Tb-PAWs bei einer Anwendung nach 12 h Lagerung in Kombination mit erhöhter Tb-PAW- Temperatur (30° C) tendenziell verschlechtert.



**Abbildung 43 (a, b, c):** Einfluss verschiedener Tb-PAW- Temperaturen (7° C, 20° C, 30° C) auf dessen bakterizide Wirksamkeit über einen Zeitraum von 24 h. An 4 Messzeitpunkten wurde *E. coli* dem Tb-PAW für 1 min ausgesetzt. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert dar. Signifikante Unterschiede sind definiert als \* $p \leq 0,05$ . Nicht signifikante Unterschiede wurden mit ns gekennzeichnet. Ctrl = Kontrolle (TRIS-Puffer); Tb-PAW = Plasma- aktiviertes Wasser; CFU = Kolonie bildende Einheit.

#### 2.4.3.5. Arbeitspaket B2 „Versuche mit Rinderklauenhaut mit Zwischenschritten auf Tierhäuten der Spezies Schwein und Geflügel“

Zu Beginn dieser Versuchsreihe wurde die Anwendung des Tb-PAWs wie im Projektplan vorgesehen, zunächst auf Rinderhautstücken getestet. Dazu wurden für die Präparation der Hauptstücke Rinderbeine von einem Schlachtbetrieb beschafft und bei -18 °C eingefroren. Die Haut wurde zunächst abpräpariert, das Unterhautfettgewebe entfernt und im Anschluss die Haut zweimal gründlich mit Seife gewaschen. Es wurden Versuche zum Vergleich von geschorener (Aesculap® Favorita II (GT104), Braun, Germany) und rasierter Haut (handelsüblicher Einmalrasierer) durchgeführt. Die Rasierklingen verursachten hierbei Wunden in der Haut und sorgten für eine ungenügende Entfernung des Fells, wodurch sich die Rasur gegenüber der Schur nicht durchsetzen konnte. Deshalb wurde für die nachstehenden Versuche sowohl Haut mit Fell, als auch geschorene Haut vorbereitet. Da die geschorene Haut ein weiteres Mal gewaschen werden musste, wurde zur Vergleichbarkeit auch das Stück mit Fell ein weiteres Mal mit Seife gewaschen. Über eine sterile Schablone von 2 x 2 cm wurde im Anschluss die vorgereinigte Haut in definierte Größen zugeschnitten (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Präparierte Rinderklaue, abgelöste Rinderklauenhaut und folgender Erstellung von Hautstanzen mittels Schablone.

Zur Evaluierung eines geeigneten Dekontaminationsverfahrens wurden verschiedene Behandlungsmöglichkeiten ausprobiert, wobei zur Bestimmung des Dekontaminationserfolges die Gesamtkeimzahl- Gehalte (Tupfverfahren) der Hautproben vor und nach der in Tabelle 9 dargestellten Behandlungen bestimmt wurde. Die Ergebnisse zeigten nur eine geringe Reduzierung des Bakteriengehaltes auf der Klauenhaut. Das bisher erfolgreichste Verfahren stellte die Kombination aus 70%igem Ethanol mit einer Einwirkzeit von 30 min auf der Haut, sowie einer anschließenden 60- minütigen UV- Bestrahlung dar.

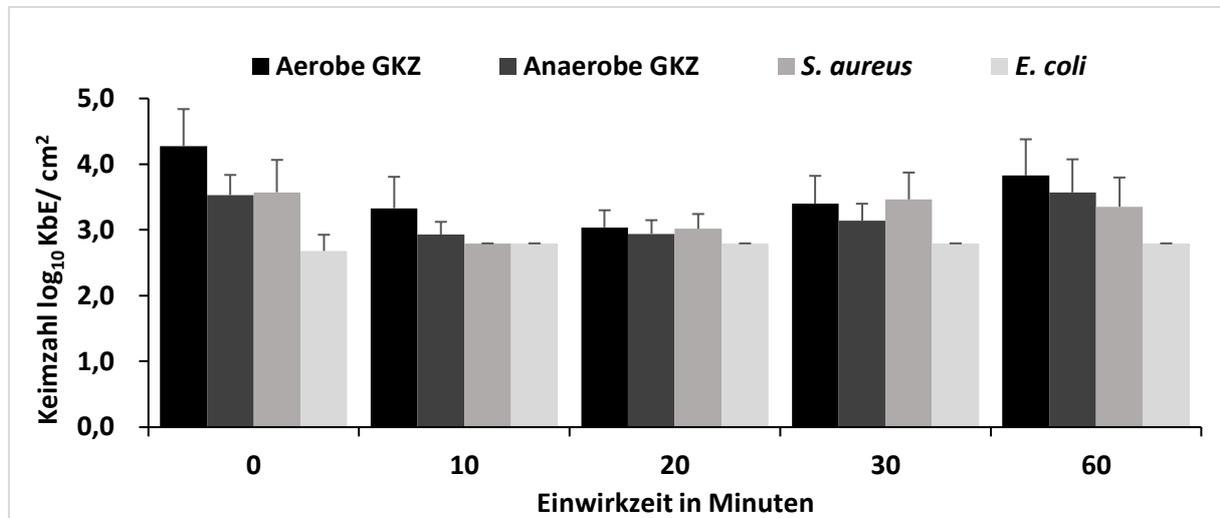
Allerdings wurden die Hautstücke durch die Behandlung sehr stark ausgetrocknet und machten somit eine spätere Verwendung für die Inokulation mit den Bakterien schwierig. Ebenso erschwerte das vorhandene Fell, welches auch nach sorgfältiger Arbeit nicht ohne Abrasion von der Haut entfernt werden konnte, die Dekontamination der Hautstücke.

**Tabelle 9:** Ergebnisse verschiedener Dekontaminationsverfahren auf der Rinderhaut

Verwendete Hautstücke	Dekontaminationsverfahren und Einwirkzeit	Ergebnisse
geschoren	70%iger Ethanol (wie lange? Unten auch ergänzen) → ggf. nur: abgewischt	geringe Reduktion der Bakterienzahl
mit Fell		keine Reduktion der Bakterienzahl
geschoren	Sterilium	gute Reduktion der Bakterienzahl
mit Fell		geringe Reduktion der Bakterienzahl
geschoren	70%iger Ethanol + Jod	gute Reduktion der Bakterienzahl
mit Fell		geringe Reduktion der Bakterienzahl
geschoren	Eiweißentferner	geringe Reduktion der Bakterienzahl
mit Fell		geringe Reduktion der Bakterienzahl
geschoren	70%iger Ethanol (30 min) + UV- Behandlung (15 min)	mäßige Reduktion der Bakterienzahl
geschoren	70%iger Ethanol (30 min) + UV- Behandlung (30 min)	gute Reduktion der Bakterienzahl
geschoren	70%iger Ethanol (30 min) + UV- Behandlung (60 min)	sehr gute Reduktion der Bakterienzahl

Nach weiterer Literaturrecherche und in Anlehnung der Ergebnisse aus den bisher erfolgten Dekontaminationsversuchen wurde ein Desinfektionsmittel-Gemisch mit einer Endkonzentration von 75% Isopropanol und 0,126% Wasserstoffperoxid hergestellt. Als Kontrolle zum erzielten Dekontaminationserfolg diente jeweils ein nicht mit Desinfektionsmittel behandeltes Hautstück. Es wurden Einwirkzeiten von 10, 20, 30 und 60 min gewählt. Ausgewertet wurden die Keimzahlen der aeroben und anaeroben Keime, sowie die von *S. aureus* und *E. coli* (Indikatoren für natürliche Kontamination). Wie in Abbildung 45 erkennbar ist, konnte mit dem Desinfektionsmittel-Gemisch die aerobe Gesamtkeimzahl

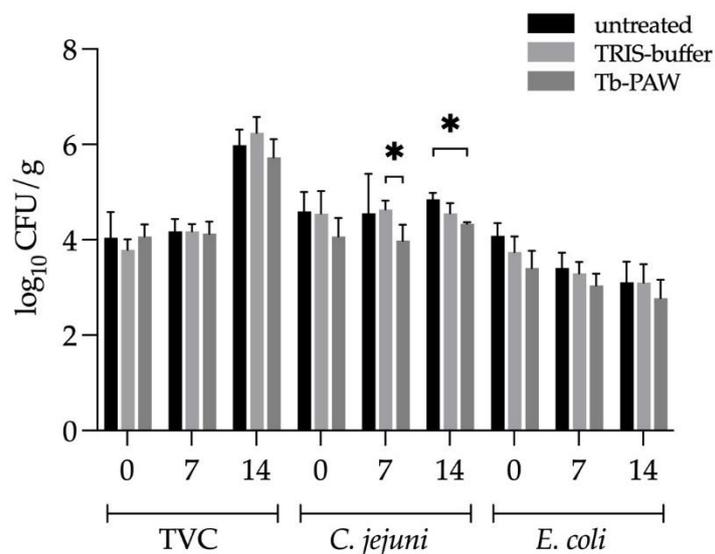
(GKZ) im Vergleich zu nicht behandelter Haut um  $1,3 \log_{10} \text{KbE/cm}^2$  reduziert werden. Auch für die anaerobe GKZ und *S. aureus* zeigten sich nach zehn- und zwanzigminütiger Einwirkzeit Reduktionen um 0,6 und 0,8 bzw.  $0,6 \log_{10} \text{KbE/cm}^2$ . Die Keimzahl von *E. coli* befand sich bei allen Hautstücken unter der Nachweisgrenze und wurde aus diesem Grund mit der halben Nachweisgrenze angegeben ( $1,7 \log_{10} \text{KbE/cm}^2$ ).



**Abbildung 45:** Darstellung des Keimgehaltes nach Behandlung von Rinderhaut mit 75 % Isopropanol und 0,126 % Wasserstoffperoxid in Abhängigkeit von der Einwirkzeit ( $n \geq 3$ ).

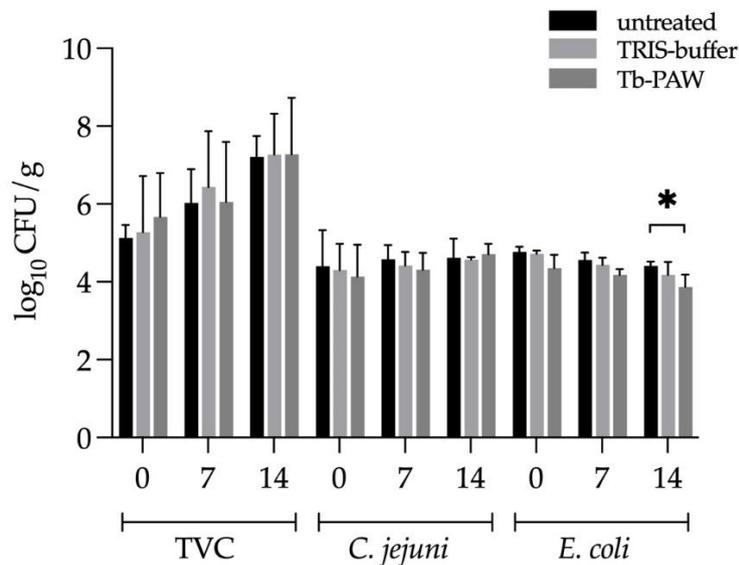
Auch nach Reinigung, Rasur und Schur war die Rinderklauenhaut durch eine hohe mikrobielle Keimzahl gekennzeichnet. Es wurde beantragt, die Reduktionswirkung des Tb-PAWs auf Tierhäuten anderer Spezies zu untersuchen, da diese eine etwas weniger komplexe Matrix gegenüber der Rinderhaut darstellen könnten. In die Versuchsreihe wurden Untersuchungen auf Häuten von Geflügel (Hähnchen, Ente) integriert, da diese bereits während der Schlachtung keimreduzierenden Prozessen (z.B. Brühen) unterzogen werden und somit eine vorerst bessere Grundlage für die Untersuchung der Wirksamkeit des Tb-PAWs auf Häuten bieten. Um diese Versuche durchführen zu können, wurde zunächst ein geeignetes Sprühverfahren entwickelt. Hier wurde zunächst durch Anwendung der Sprühtechnik die Wirksamkeit des Tb-PAWs nach dem Sprühen bestimmt (*in vitro*). *E. coli* diente hierbei als Referenzkeim. Nach dreifacher Versuchsdurchführung konnte keine verminderte Wirksamkeit des Tb-PAWs festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte in den folgenden Versuchen ein Sprühvolumen von ca. 3 ml ermittelt werden, mit dem die Hautstücke gut mit Tb-PAW bedeckt waren. Hierbei war zu beachten, dass der Druck der Sprühtropfen und die Menge der aufgetragenen Flüssigkeit zum Versprengen oder Abspülen der applizierten und über 30 min-anheften-lassenden Mikroorganismen führen kann. Diese Erkenntnisse sollen sich entsprechend auf die Versuche an den Rinderklauen selbst übertragen lassen. In der weiteren Versuchsphase wurden zunächst *E. coli* ( $10^7 \text{KbE/ml}$ ) und *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*;  $10^8 \text{KbE/ml}$ ) auf Hähnchenschenkeln mit Haut inokuliert und mit Tb-PAW besprüht.

*jejuni* wurde ausgewählt, da er ein auf Geflügelhaut sehr relevanter Mikroorganismus ist, der für Lebensmittel-assoziierten gastrointestinalen Erkrankungen beim Menschen verantwortlich sein kann. Als Kontrolle wurden weitere Schenkel mit TRIS-Puffer besprüht und einige Schenkel ohne Behandlung belassen. Außerdem wurde die originäre Keimflora (GKZ) auf der Hähnchenbrusthaut untersucht und wie oben beschrieben behandelt. Die Proben wurden nach der Sprühbehandlung unter einer modifizierten Schutzgasatmosphäre (30% CO<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>) verpackt, für 14 Tage bei 4 °C gelagert und an Tag 0, 7 und 14 beprobt. Dafür wurde die Haut von jedem Schenkel abpräpariert. Mittels Stomacher® 400 Circulator (VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten) konnte die vorhandene Keimflora aus der Probe in die Lösung extrahiert und nach der Verdünnungsreihe zur Auswertung auf Agarplatten gebracht werden. Derselbe Versuchsaufbau wurde später mit Entenhaut durchgeführt. Die Ergebnisse zu den Versuchsreihen sind in Abbildung 46 & 47 dargestellt. Bei den Hähnchen-Proben konnte an Tag 7 und 14 der Lagerung eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Reduktion von *C. jejuni* erreicht werden. Dabei wurde die Reduktion am 7. Tag im Vergleich zur TRIS-Puffer-Kontrolle beobachtet, während die Reduktion an Tag 14 zwischen Tb-PAW und der unbehandelten Gruppe auftrat. Allerdings wiesen *E. coli* und die originären Keimflora über die gesamte Lagerzeit keine verbesserte Reduktion nach Tb-PAW-Behandlung auf. Im Gegensatz zur Hähnchenhaut wurde bei der Entenhaut an Tag 14 der Lagerung *E. coli* im Vergleich zu der unbehandelten Probe deutlich reduziert. Bei der originären Keimflora und *C. jejuni* konnte kein signifikanter Effekt der Tb-PAW-Behandlung festgestellt werden.



**Abbildung 46.** Verringerung der Gesamtkeimzahl (TVC), von *Campylobacter (C.) jejuni* und *Escherichia (E.) coli* auf Hähnchenschlachtkörpern mit oder ohne Tb-PAW/ TRIS-Puffer-Behandlung. Unbehandelte und behandelte Brüste (TVC) und Schenkel (*C. jejuni* und *E. coli*) mit Haut wurden 14 Tage lang in Schutzgasverpackungen (30 % CO<sub>2</sub>, 70 % N<sub>2</sub>) bei 4 °C gelagert. Die Proben von Tag 0 wurden am Tag der Verpackung analysiert, die anderen

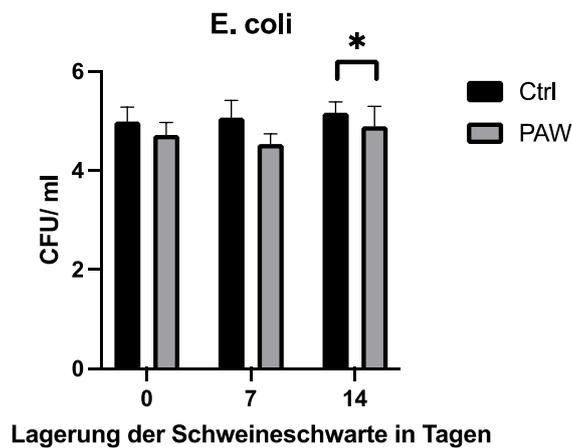
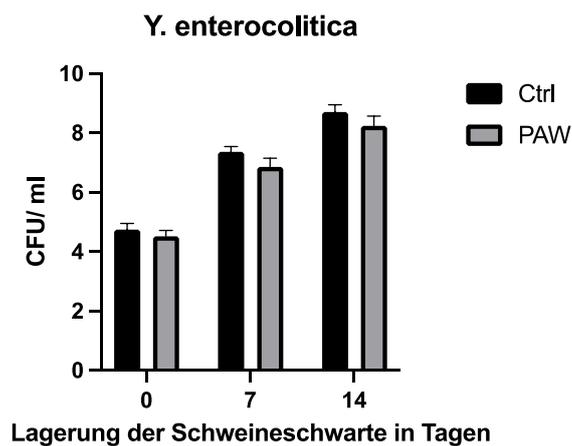
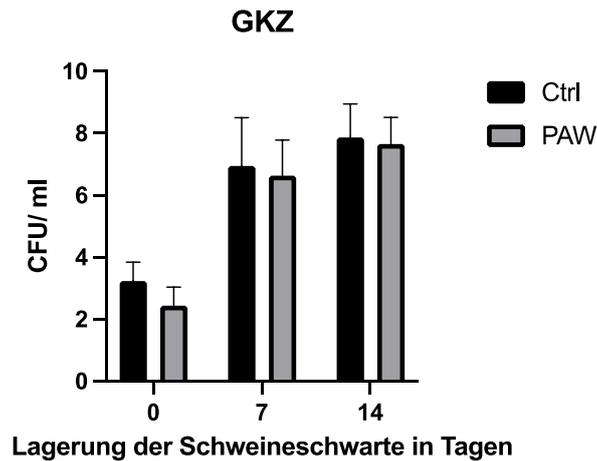
entsprechend ohne Nachbehandlung an Tag 7 und 14. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dar. Signifikante Unterschiede sind definiert als \*  $p \leq 0,05$ . Tb-PAW = TRIS-gepuffertes plasma-aktiviertes Wasser.



**Abbildung 47.** Verringerung der Gesamtkeimzahl (TVC), von *Campylobacter (C.) jejuni* und *Escherichia (E.) coli* auf Entenschlachtetkörpern mit oder ohne Tb-PAW/ TRIS-Puffer-Behandlung. Unbehandelte und behandelte Brüste (TVC) und Schenkel (*C. jejuni* und *E. coli*) mit Haut wurden 14 Tage lang in Schutzgasverpackungen (30 % CO<sub>2</sub>, 70 % N<sub>2</sub>) bei 4 °C gelagert. Die Proben von Tag 0 wurden am Tag der Verpackung analysiert, die anderen entsprechend ohne Nachbehandlung an Tag 7 und 14. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dar. Signifikante Unterschiede sind definiert als \*  $p \leq 0,05$ . Tb-PAW = TRIS-gepuffertes plasma-aktiviertes Wasser.

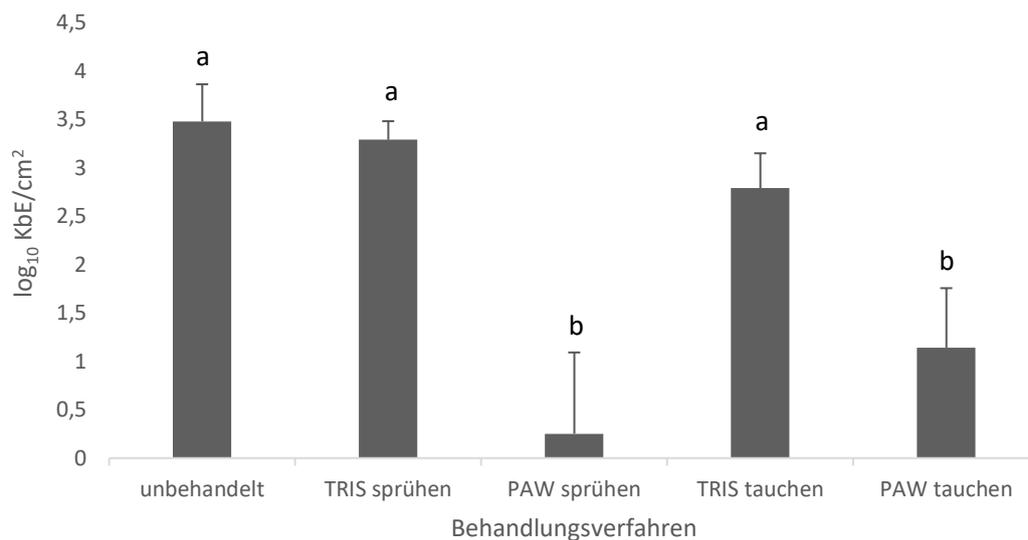
Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden vergleichbare Versuche unter Verwendung von Schweinehaut (Schwarte) durchgeführt. Schwarte besitzt den technologischen Vorteil, dass die Schweine im Laufe des Schlachtprozesses zunächst im Brühkessel erhitzt werden, im Anschluss aber zur umfassenden Entfernung der Borsten zusätzlich abgeflammt werden. Aus diesem Grund wurde die Schweinehaut als weiterer Zwischenschritt im Arbeitspaket vorgesehen. In dieser Versuchsphase wurden zunächst von einem Schlachthof tagfrisch Schweineschwarten von je 6 geschlachteten Tieren entnommen. Diese wurden gekühlt zum LMQS gebracht und für 24 h gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde das Unterhautfett der Schwarten entfernt und die Haut in 64 cm<sup>2</sup> große Stücke zerteilt. Die Hautstücke wurden entweder mit TRIS-Puffer bzw. Tb-PAW behandelt. Im Anschluss wurden die Häute (außer der Proben für die Gesamtkeimzahl (GKZ)) mit 70%igem Ethanol besprüht bei einer fünfminütigen Einwirkzeit. Es folgten 3 Waschschrte mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung). Nach Beendigung der Präparation wurden zwei Drittel der Schwarten zunächst mit *E. coli* (10<sup>7</sup>

KbE/ml) bzw. *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*;  $10^8$  KbE/ml), einem häufig beim Schwein auf der Haut auftretenden Keim, inokuliert und mit Tb-PAW besprüht (1 ml). Als Kontrolle wurde TRIS-Puffer eingesetzt. Weiterhin wurde die originäre Keimflora (GKZ) auf der Schweineschwarte beprobt, diese Schwarten wurden ebenfalls mit Tb-PAW bzw. TRIS-Puffer behandelt. Im Anschluss wurden die Schwarten ebenfalls unter Schutzgasatmosphäre (70% Stickstoff; 30% Kohlendioxid) verpackt und für 0, 7 und 14 Tage gelagert. An diesen Zeitpunkten wurden die Proben wieder entpackt und die Keimzahl mittels Tupfverfahren und anschließender Verdünnungsreihe untersucht. Hierbei konnte bei *E. coli* eine signifikante Reduktion am 14. Tag nach der Tb-PAW-Behandlung erzielt werden. Somit konnte ein weiterer Abschnitt des AP B2 erfolgreich abgeschlossen werden und vorbereitende Erkenntnisse für die Durchführung der Rinderhautversuche erzielt werden.

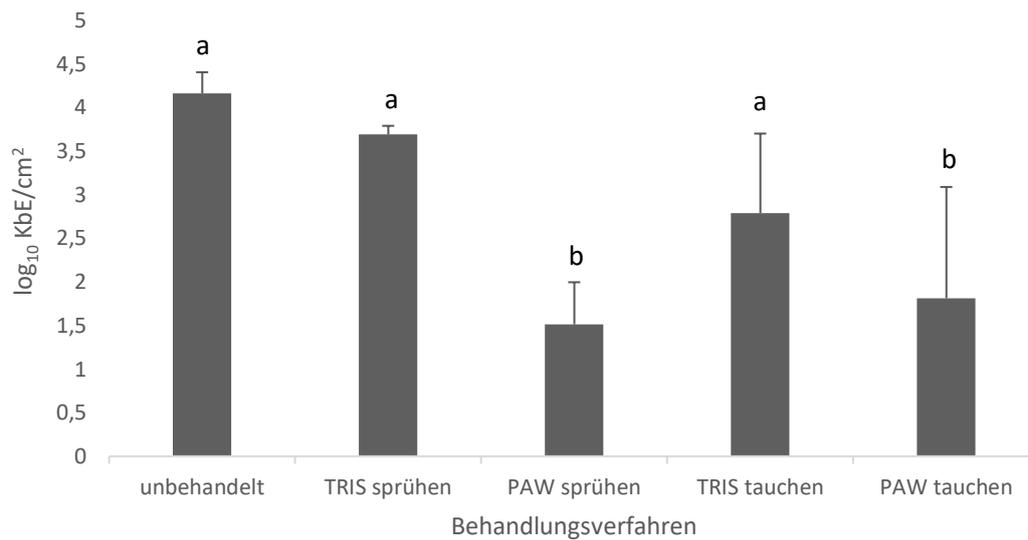


**Abbildung 48:** Einfluss von Tb-PAW auf die GKZ, *Y. enterocolitica* und *E. coli* auf Schweineschwarte über eine Lagerung von 14 Tagen (n=3). Der TRIS-Puffer dient hier als Kontrolle. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dar. Signifikante Unterschiede sind definiert als  $*p \leq 0,05$ . Gesamtkeimzahl = GKZ; Tb-PAW= Plasma-aktiviertes Wasser; Ctrl = Kontrolle (TRIS-Puffer).

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erfahrungswerte mit Geflügel- und Schweinehaut wurde die Haut für die sich anschließenden Rinderhautversuche wie oben beschrieben präpariert, dieses Mal jedoch nicht nur geschoren oder rasiert, sondern beide Schritte nacheinander durchgeführt. Im Anschluss wurde die Haut in 16 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten, 5 min mit 70%igem Ethanol behandelt, 3-mal mit PBS gewaschen und in Petrischalen gelegt. Die Hautstücke wurde mit *E. coli*, *F. necrophorum* oder *P. levii* inokuliert. Nach einer 30 min Adaptation der Keime an die Haut wurden die Stücke entweder unbehandelt belassen oder mit Tb-PAW bzw. TRIS-Puffer (Kontrolle) besprüht bzw. eingetaucht. Die Behandlungszeit betrug eine Minute. Zur Überprüfung der Tb-PAW-Wirkung über 24 h wurde ein Teil der Proben nach 24 h erneut besprüht oder eingetaucht und erst dann beprobt. Zur Beprobung wurde das Tupferverfahren angewendet. Die Ergebnisse des Versuches für *E. coli* sind in Abbildung 49 (direkte Beprobung) und Abbildung 50 (Beprobung nach 24 h) dargestellt. Es konnten signifikante Reduktionen sowohl für die Sprüh- als auch für die Tauchbehandlung mittels Tb-PAW erzielt werden. Dabei wurden die Unterschiede zwischen der TRIS-Kontrolle und den Tb-PAW-Proben gefunden sowie zwischen den unbehandelten Kontrollen und den Tb-PAW-Proben. Nach einer erneuten Behandlung nach 24 h wurden auch hier signifikante Reduktionen zwischen den erwähnten Kombinationen festgestellt. *F. necrophorum* und *P. levii* zeigten keine signifikanten Keimreduktionen durch die jeweiligen Behandlungsverfahren Aufgrund insgesamt nur sehr geringer Wachstumsraten der Bakterien in allen Durchgängen sind die Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 49:** Verringerung von *Escherichia coli* auf Rinderhaut mit oder ohne Tb-PAW/ TRIS-Puffer-Behandlung (Sprüh- bzw. Tauchbehandlung). Die Proben wurden nach einer Einwirkzeit von 1 min beprobt. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert ± Standardabweichung dar. <sup>ab</sup> Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben weisen auf eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Reduktion hin.



**Abbildung 50:** Verringerung von *Escherichia coli* auf Rinderhaut mit oder ohne Tb-PAW/ TRIS-Puffer-Behandlung (Sprüh- bzw. Tauchbehandlung). Die Proben wurden sowohl direkt als auch nach einer Lagerung von 24 h behandelt und anschließend beprobt. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dar. <sup>ab</sup>Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben weisen auf eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Reduktion hin.

#### 2.4.3.6. Arbeitspaket B3 „Untersuchung von Auswirkungen der Plasmawasserbehandlung in der Zellkultur“

Über den MTT- Versuch wurde die optimale Zellvitalität der verwendeten Zelllinie (HaCaT, humane Keratinozyten) zur weiteren Nutzung für die Versuche mittels PCR und ELISA bestimmt. Dazu wurden die Zellen (jeweils 10.000 Z/Well) in zwei 96 Well-Platten eingesät (Überprüfung der Viabilität zu zwei Zeitpunkten, s. Abbildung 52). In die zellfreie Kontrolle wurden keine Zellen eingesät, sondern diese nur mit Medium befüllt. Nach ca. 24 h sollten die Zellen etwa zu 80 % konfluent und gleichmäßig verteilt sein. Als Kontrolle dienten zum einen 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS026:B6, zum anderen diente als Lebendkontrolle frisches Medium und als Totkontrolle wurde frisches Zellkulturmedium mit 0,01 % (v/v) Triton X-100 genutzt. Als Leerwert wurde die Absorption in zellfreien Wells unter Verwendung von frischem Medium kontrolliert, um die Grundabsorption des Mediums zu erfassen und von allen Wells abziehen zu können. Zur Behandlung wurden 200  $\mu\text{L}$  Plasmawasser auf die zu behandelnden Zellen gegeben und nach Inkubationszeit von 1 Minute, 2, 3, 4, 5 und 15 min abgesaugt. Danach wurde jeweils direkt PBS auf die Zellen gegeben, bis die gesamte Inkubationszeit abgelaufen war. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig noch 2 x mit PBS gespült. Zuletzt wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben. Bei den restlichen Wells wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und in jedem Well nach Pipettierschema 200  $\mu\text{L}$  Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden über 6 h und 24 h im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

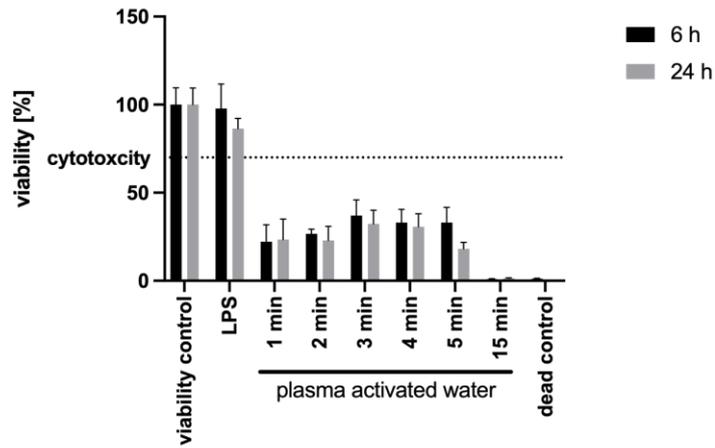
Wie anhand der Ergebnisse (Abbildung 52 a, b, c) erkennbar, wurden die Zellen durch die Tb-PAW- Anwendung stärker als die gewünschten 70 % Viabilität reduziert. Aufgrund dessen wurde das Pipettierschema und der Versuchsablauf angepasst. Im 2. Versuchsdurchlauf wurde die Konzentrationen des Tb-PAWs verändert und eine Einwirkzeit von 5 min gewählt. Auch hier wurden die Zellen bei allen Verdünnungen unter das gewünschte Niveau abgetötet. Da die Vermutung bestand, dass das verwendete PBS die Zellzahlen erheblich beeinflussen könnte, wurde von drei Waschschritten nur noch einer durchgeführt. Dies und eine Einwirkzeit von nur noch 1 min führt zu erfolgreichen Ergebnissen (Abbildung 52c). Die unerwünschten Schwankungen, die in Abbildung 52c zu erkennen sind, wurden mittels wiederholten Versuchen und einer Zusammenlegung beider Durchläufe angepasst (Abbildung 53). Anhand der Ergebnisse des MTT- Versuches ließ sich ableiten, dass die Einwirkzeit des Tb-PAWs bei der Fortsetzung der Versuche möglichst kurzgehalten werden sollte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1 Minute						LPS				
C		2 Minuten										
D		3 Minuten						Medium				
E		4 Minuten						Zellfrei, Medium				
F		5 Minuten										
G		15 Minuten						Medium 0,01 % Triton X				
H												

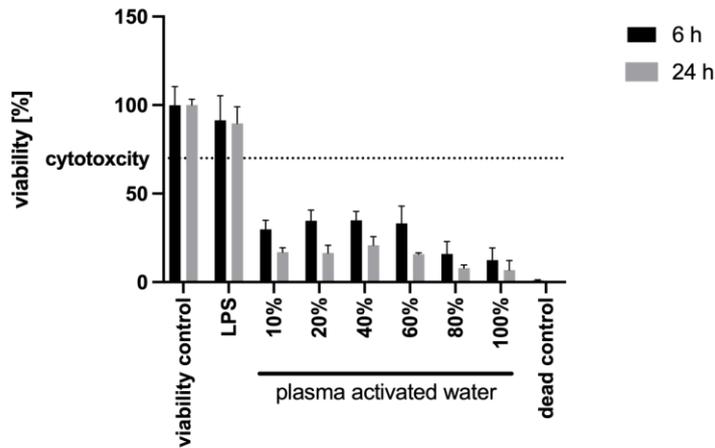
PBS
Plasmawasser/LPS
LPS
Lebendkontrolle
Zellfrei
Totkontrolle

**Abbildung 51:** Pipettierschema für die Plasmawasserbehandlung.

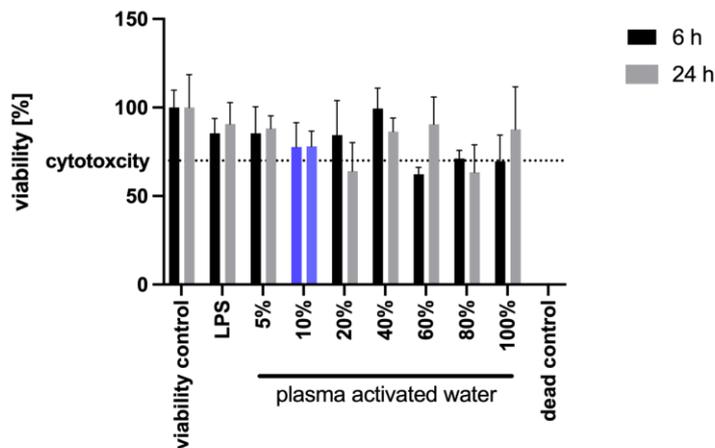
**a** zeitabhängige Applikation von 100% Plasmawasser



**b** Plasmawasser in Zellkulturmedium, 5 min



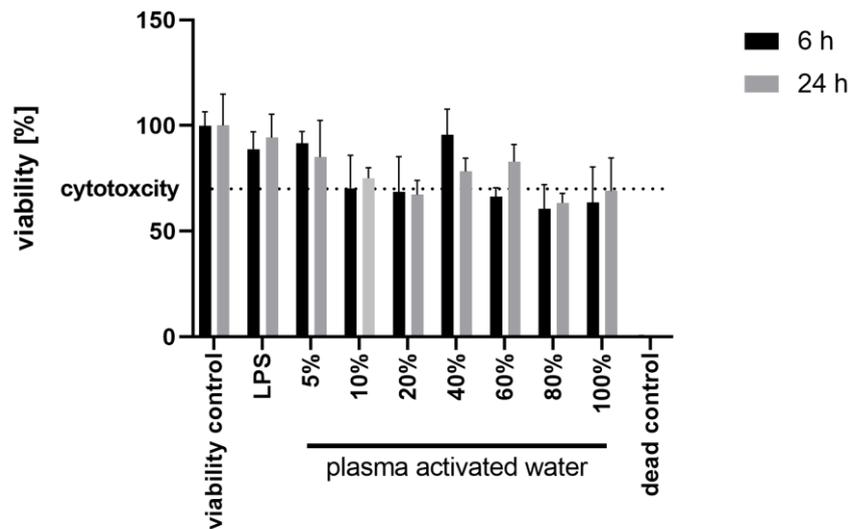
**c** Plasmawasser in Zellkulturmedium, 1 min



**Abbildung 52 (a, b, c):** Viabilität von HaCaTs nach verschiedenen Anwendungen von Plasma-aktiviertem Wasser. **(a)** verschiedene Einwirkzeiten des Tb-PAW, **(b)** verschiedene

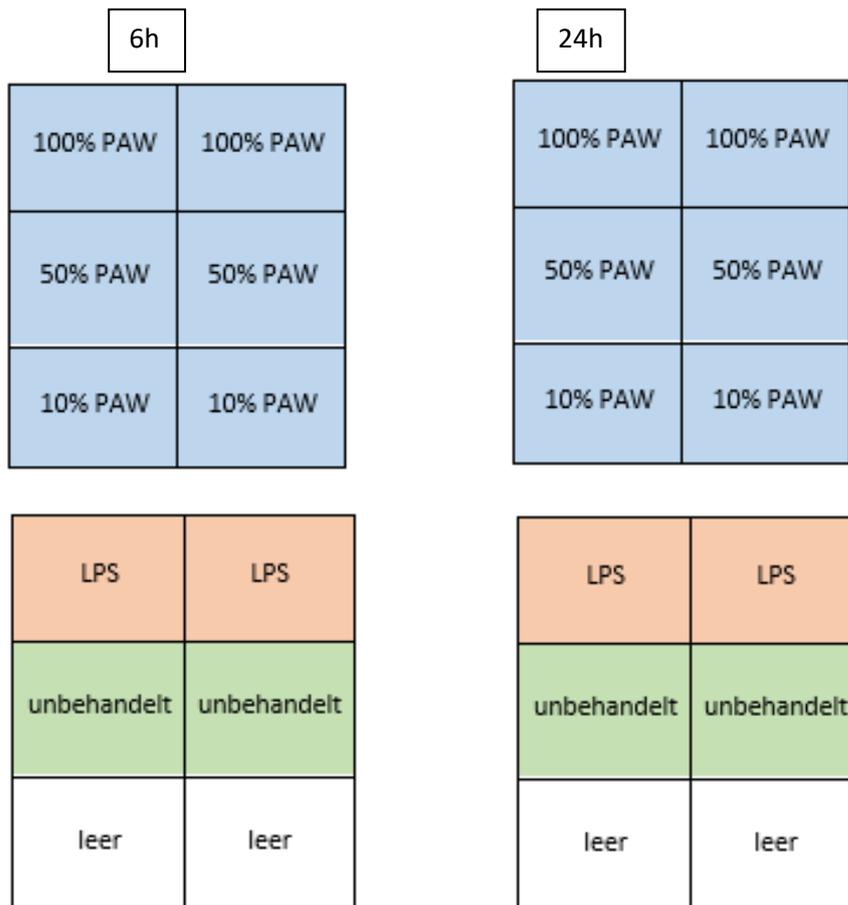
Konzentrationen des Tb-PAW bei 5 min Einwirkzeit, (c) verschiedene Konzentrationen des Tb-PAW bei 1 min Einwirkzeit.

Plasmawasser in Zellkulturmedium, 1 min, zusammengefügt



**Abbildung 53:** Viabilität von HaCaTs nach Anwendung verschiedener Konzentrationen des Tb-PAW bei 1 min Einwirkzeit und nach Zusammenlegung der beiden Versuchsdurchläufe.

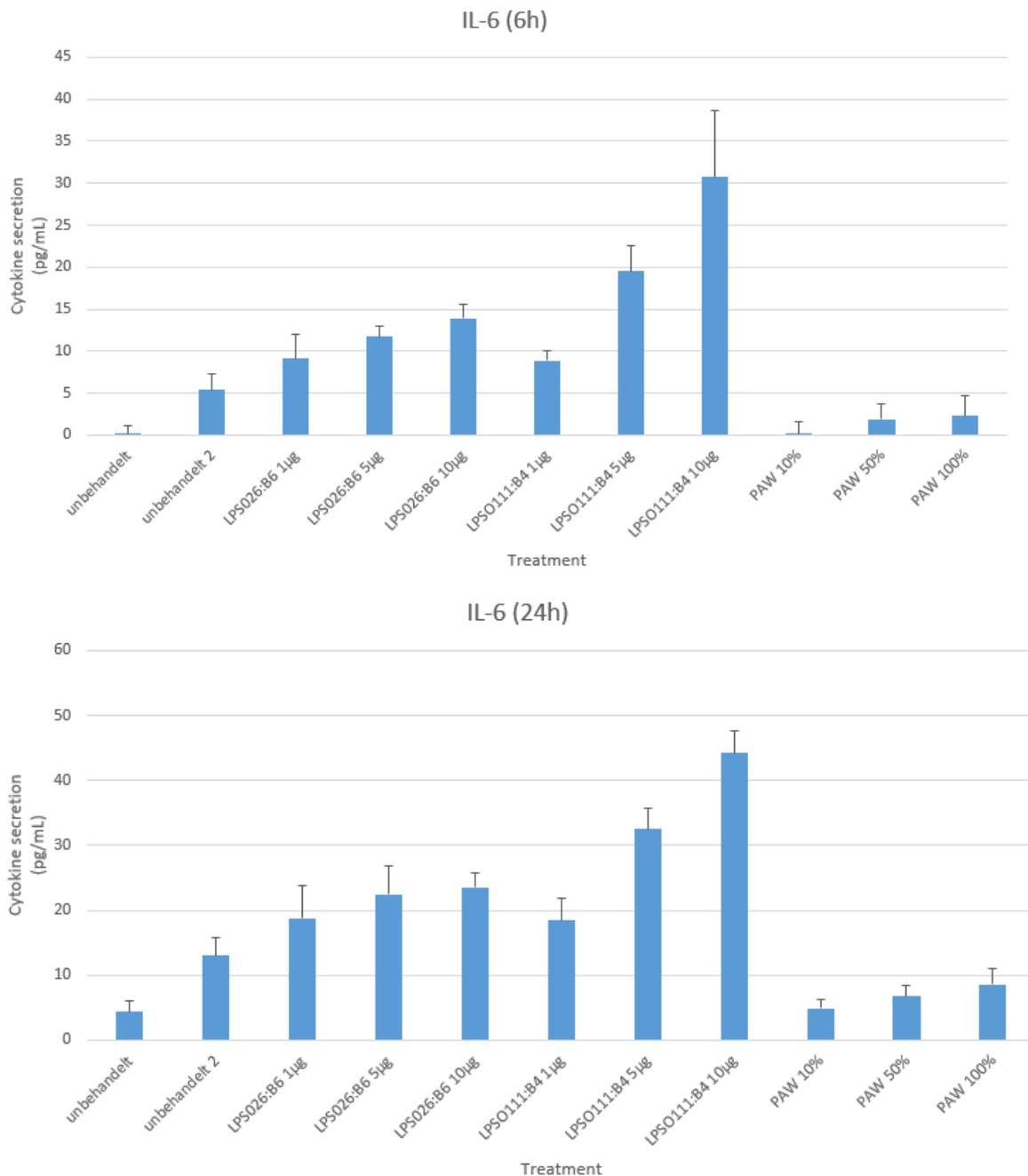
Für die PCR und ELISA- Versuche wurden Tb-PAW-Konzentrationen von 10%, 50% sowie 100% eingesetzt. Für die Untersuchungen der Proben mittels PCR und ELISA wurden jeweils 250.000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte eingesät, insgesamt wurden 20 Wells auf 4 Platten benötigt. Die Zellen wurden nach Behandlungsschema (s. Abbildung 54) mit Plasmawasser, 1 µg/ml LPS026:B6 (Positivkontrolle) behandelt oder unbehandelt belassen (Negativ-Kontrolle). Es wurde immer ein doppelter Ansatz der Proben gefahren. Das Plasmawasser wurde 100%ig, 50%ig und 10%ig auf die Zellen gegeben (2 ml) und nach einer Inkubationszeit von 1 min abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig einmal mit 2 ml PBS gespült. Danach wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben. Jede Behandlung erfolgte einzeln. Das Plasmawasser wurde erst nach Abzug des Mediums, unmittelbar vor der Behandlung mit Medium gemischt. Bei den restlichen Wells wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, einmal mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend in jedem Well nach Pipettierschema mit 2 ml Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden dann über 6 h und 24 ± 2 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.



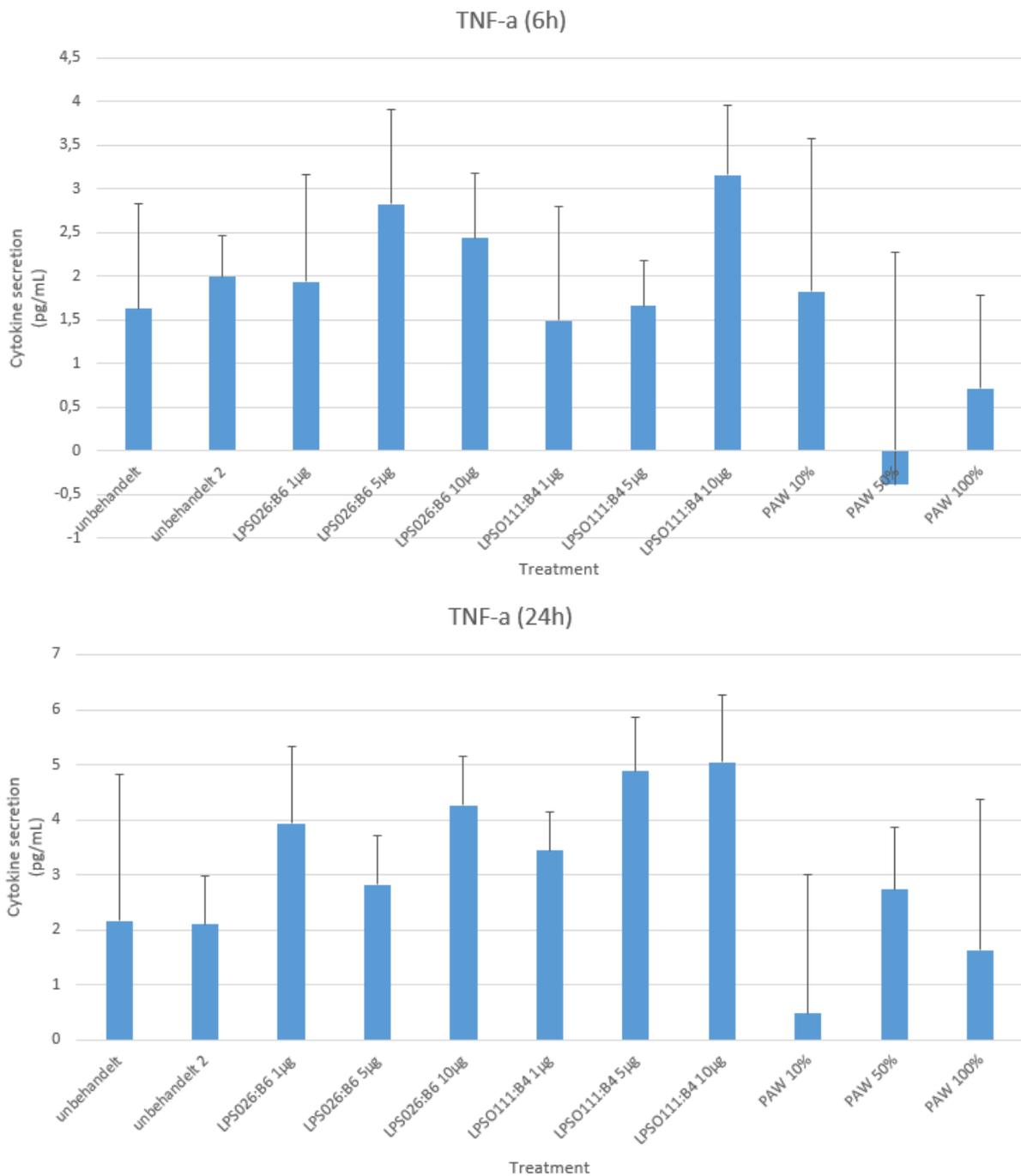
**Abbildung 54:** Pipettierschema auf einer 6-Well-Platte für die Plasmawasserbehandlung von humanen Zelllinien (HaCaTs).

Für die Ernte der Zellen wurden die Wells auf Eis gelagert. Sowohl nach 6 h als auch nach 24 h wurde der Überstand für die ELISA-Bestimmung in 2,5 ml Eppendorf Tubes überführt und diese bis zur weiteren Untersuchung bei  $-12^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Im Anschluss wurden 2 ml PBS auf die Zellen gegeben und diese mittels Schaber vorsichtig vom Boden des Wells gelöst und jeweils in ein 15 ml Falcon überführt. Dieser Schritt wurde weitere 2 Mal wiederholt bis alle Zellen vom Boden gelöst waren. Nach Zentrifugation (10 min, 1000g,  $4^{\circ}\text{C}$ ) der Falcons wurde der Überstand verworfen und die Pellets jeweils in 1 ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt. Diese wurden ein weiteres Mal zentrifugiert (10 min, 2000g,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und der Überstand verworfen, sodass die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zur weiteren Verfahrung eingefroren werden konnte. Nach Auswertung der Ergebnisse der PCR und ELISA-Versuche wurde festgestellt, dass die LPS-Kontrolle in einer Konzentration von  $1\ \mu\text{g/ml}$  keine Wirkung hervorgebracht hat. Ohne diese Kontrolle wird die Auswertung der restlichen Ergebnisse jedoch erschwert. Aus diesem Grund wurde sich nach ausführlicher Recherche dazu entschieden, weitere Konzentrationen ( $5\ \mu\text{g/ml}$  und  $10\ \mu\text{g/ml}$ ) sowie eine alternative LPS- Variante zu verwenden. Für die korrekte Anwendung der Kontrollen wurde zunächst der MTT-Test (Viabilitätstest) wiederholt. Nach Auswertung der Ergebnisse konnten alle Kontrollen

für die PCR und ELISA-Versuche verwendet werden. Die Abbildungen 55 und 56 zeigen die Menge der Sekretion von 2 untersuchten Entzündungsparametern (IL-6 und TNF- $\alpha$ ). Anhand der Daten konnte veranschaulicht werden, dass im Vergleich zu den LPS-Kontrollen deutlich weniger Zytokine (vor allem bei IL-6) nach Tb-PAW- Anwendung ausgeschüttet wurden. Um eine finale Aussage über die toxischen Eigenschaften von Tb-PAW zu treffen sollten noch mehrere Entzündungsparameter untersucht werden, aber die vorliegenden Daten deuten auf einen nicht-toxischen Einfluss des Tb-PAW hin.



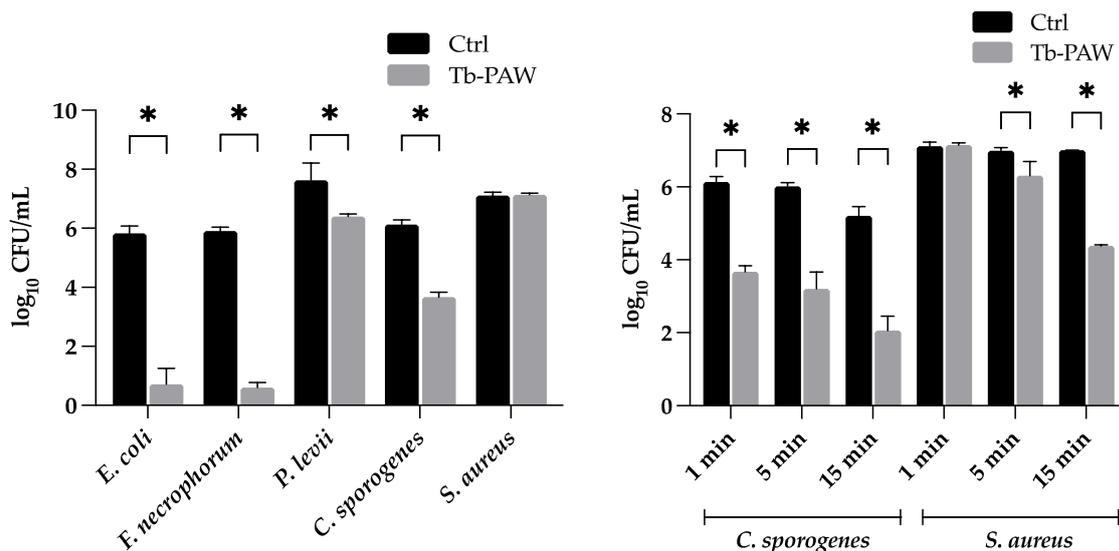
**Abbildung 55:** Zytokinmenge von IL-6 nach Plasmawasserbehandlung von humanen Zelllinien (HaCaTs). **(a)** Sekretionszeit 6 h. **(b)** Sekretionszeit 24 h. LPS = Lipopolysaccharide; Positivkontrollen.



**Abbildung 56:** Zytokinmenge von TNF- $\alpha$  nach Plasmawasserbehandlung von humanen Zelllinien (HaCaTs). **(a)** Sekretionszeit 6 h. **(b)** Sekretionszeit 24 h. LPS = Lipopolysaccharide; Positivkontrollen.

### 2.4.3.7. Arbeitspaket B4 „Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Mikroorganismen zur Evaluation der Wirkung der Plasmawasserbehandlung“

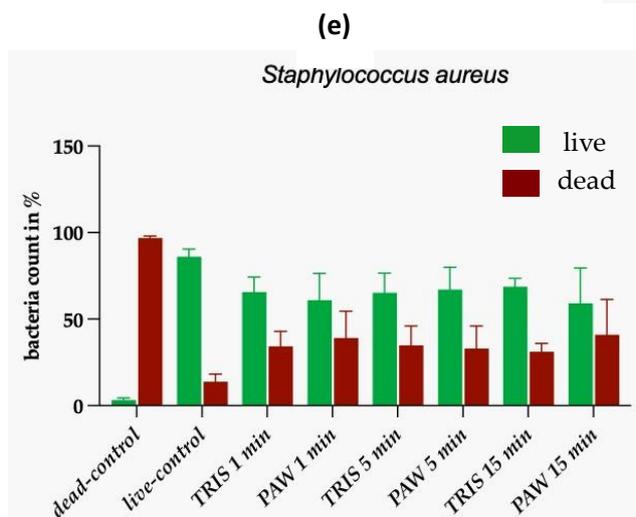
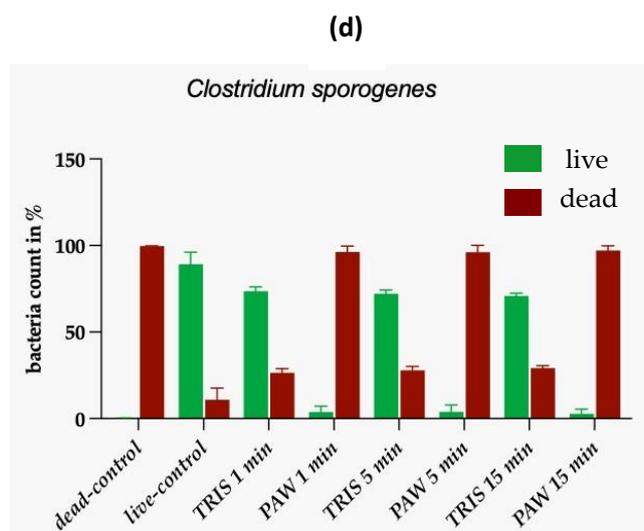
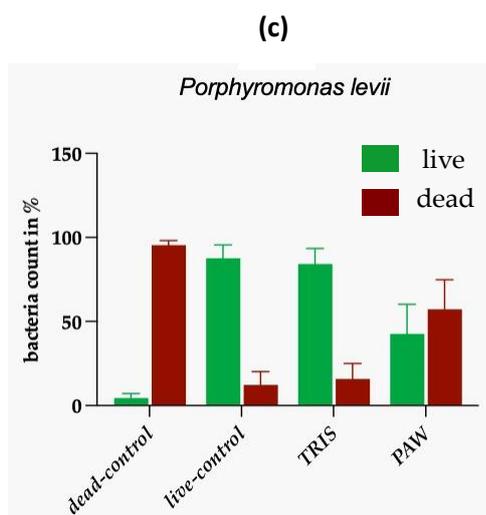
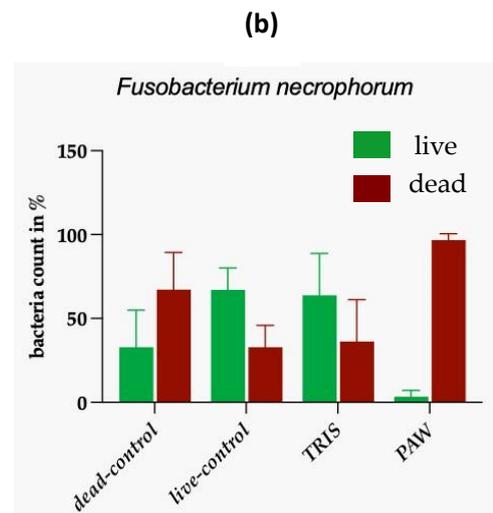
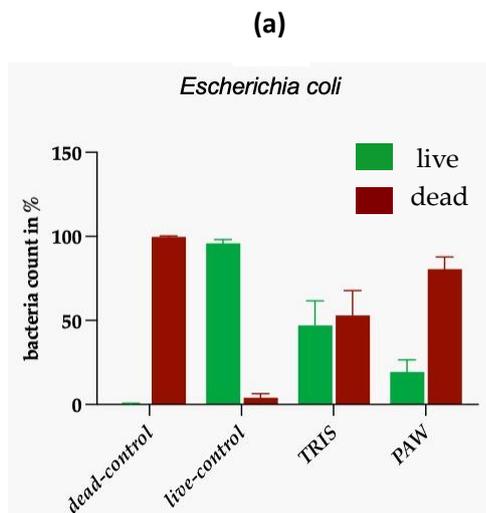
Für diese Versuche wurde das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit Syto™ 9 und Propidiumjodid (PI) als Fluoreszenzfärbung verwendet. Hierbei markiert Syto™ 9 alle Bakterienzellen mit intakten und beschädigten Membranen, wohingegen PI nur in Bakterien mit beschädigten Membranen eindringt und so zu einer Verringerung der Fluoreszenz der SYTO™ 9-Färbung führt. Abgetötete Bakterienzellen erscheinen rot gefärbt, während die lebenden Zellen grün gefärbt erscheinen. Die Bakterien *F. necrophorum*, *P. levii*, *E. coli*, *S. aureus* und *C. sporogenes* wurden mit Tb-PAW vom TJ behandelt. Anschließend wurden je ein Volumen von 20 µL der Suspensionen mit 10<sup>6</sup> CFU/ml in eine 96-Well-Glass bottom plate überführt (im Doppelansatz). Hier wurden zuvor jeweils 180 µL Natriumchlorid (0,85%) vorgelegt. Im Anschluss wurden die Proben fluoreszierend angefärbt. Die Bilder wurden von drei zufällig ausgewählten Bereichen aufgenommen. Für die qualitative Analyse wurden grüne (lebende), rote (tote) und orange/gelbe (intermediär = subletal geschädigte) Bakterienzellen herangezogen. Subletal geschädigte Mikroorganismen sind in der Lage den entstandenen Zellschaden zu reparieren und die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien wiederzuerlangen. Die mikroskopische Untersuchung wurde mit einem konfokalen Mikroskop Leica DMI6000CS (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Die mikrobiellen Populationen wurden vor und nach der Plasmabehandlung dargestellt, zur Kontrolle wurden zum einen hitzegetötete Bakterien (10 min, 85°C), als auch TRIS-Puffer-Kontrollen (lebend-Kontrolle) verwendet.



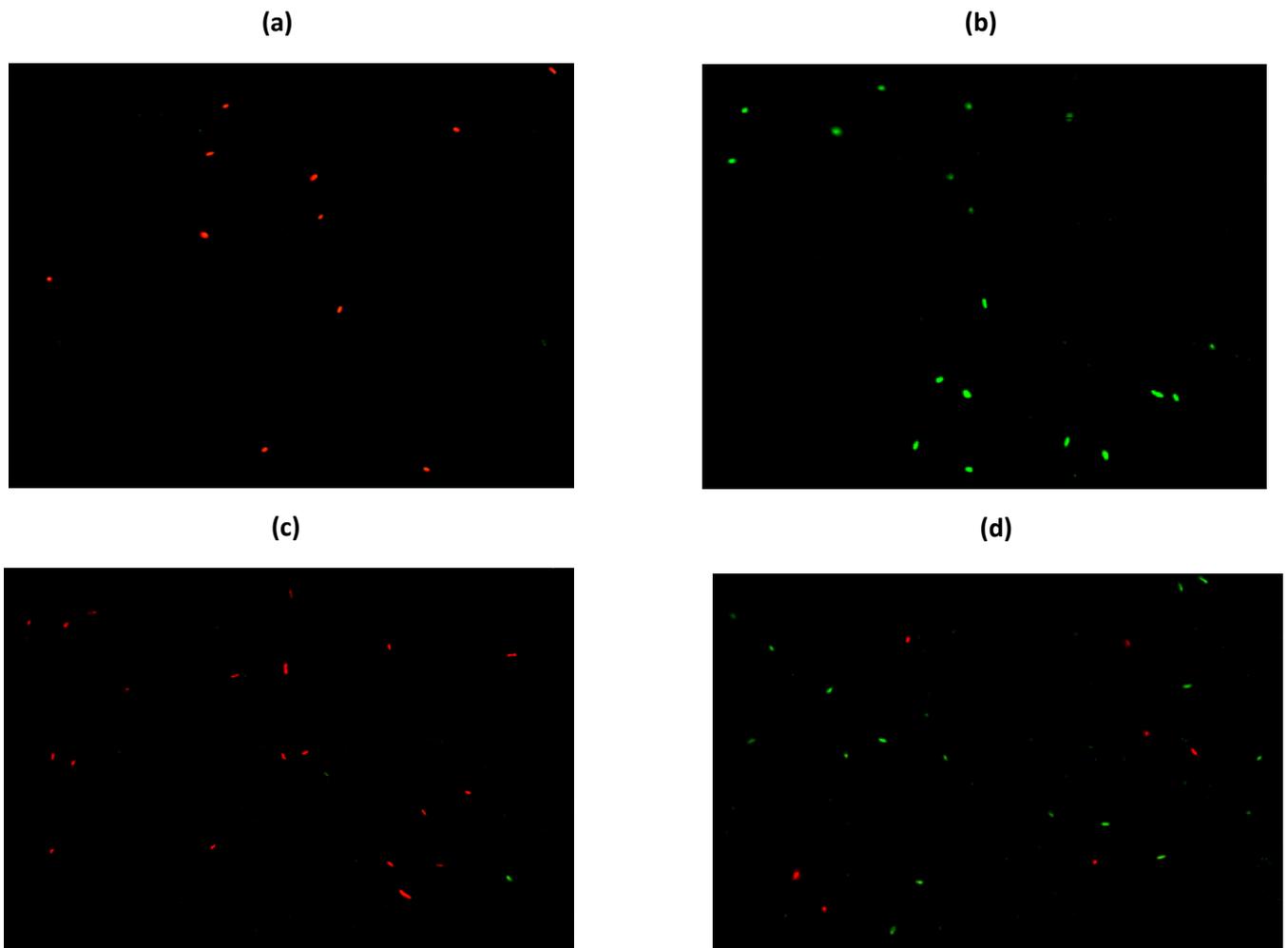
**Abbildung 57: (links)** Inaktivierung von *Escherichia (E.) coli*, *Staphylococcus (S.) aureus*, *Fusobacterium (F.) necrophorum*, *Porphyromonas (P.) levii* und *Clostridium (C.) sporogenes* nach 1 min Tb-PAW-Behandlung **(rechts)** Inaktivierung von *C. sporogenes* und *S. aureus* nach 1 min, 5 min und 15 min Tb-PAW-Behandlung. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert ±

Standardabweichung dar. Signifikante Unterschiede sind definiert als \*  $p \leq 0,05$ . Ctrl = Kontrolle (TRIS-Puffer); Tb-PAW = TRIS-gepuffertes plasma-aktiviertes Wasser.

Wie in Abbildung 57 erkennbar ist konnte das Tb-PAW *E. coli*, *F. necrophorum*, *P. levii* und *C. sporogenes* nach 1 min Einwirkzeit erfolgreich reduzieren. Für *S. aureus* hingegen konnte keine signifikante Reduktion festgestellt werden. Aufgrund der vorherigen Versuche mit dem EA und der Annahme einer schlechteren Wirkung des Tb-PAWs auf gramnegative Bakterien wurden für *C. sporogenes* und *S. aureus* weitere Einwirkzeiten von 5 min und 15 min angewendet. *C. sporogenes* und *S. aureus* konnten hier bei 5 min und 15 min sig. reduziert werden. Die Abbildung 58 zeigt die prozentualen Anteile der lebenden und toten Bakterien nach der Fluoreszenzfärbung. Diese ergänzen die Ergebnisse der kulturellen Anzucht der Bakterien und zeigen unter anderem, dass das Tb-PAW bei allen Bakterien außer *S. aureus* viele abgetötete und nicht subletal geschädigte Bakterien hervorbringt. Die TRIS-Kontrolle hat hingegen die Bakteriengehalte nicht wesentlich beeinflusst, da deutlich mehr lebende Bakterien vorhanden sind. Zur Veranschaulichung der aufgenommenen Bilder wurden unter Abbildung 59 Aufnahmen von *C. sporogenes* eingefügt.



**Abbildung 58:** Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (live/dead) nach Behandlung mit Tb-PAW, TRIS-Puffer und Hitze von (a) *Escherichia coli*, (b) *Fusobacterium necrophorum*, (c) *Porphyromonas levii*, (d) *Clostridium sporogenes* und (e) *Staphylococcus aureus*. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dar.



**Abbildung 59:** Aufnahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (live/dead) nach Behandlung mit Tb-PAW, TRIS-Puffer und Hitze von *Escherichia coli* (a) Totkontrolle durch Hitzeabtötung (b) Lebendkontrolle (c) Tb-PAW-Behandlung (d) TRIS-Puffer-Behandlung.

#### 2.4.3.8. Beratungstreffen beim OG- Mitglied BG Borchardt GBR

Im Rahmen der Bestandsbesichtigung in Zusammenarbeit mit Mitarbeiterinnen der Rinderklinik, die regelmäßig Bestandsbetreuungen durchführen und mit der DD -Diagnostik auf landwirtschaftlichen Betrieben vertraut sind, wurden beim OG Borchardt zunächst alle Ställe mit Tieren begutachtet und der Ist- Zustand dieser Ställe erhoben. Dabei wurde u.a. die Anzahl der Tiere dokumentiert sowie anderer Parameter wie Anzahl der Tränken, Liege-Fressplatz-Verhältnis und die Hygienezustände in jedem Stall notiert. Anschließend wurde jede Milchkuh zunächst einem sogenannten Body Condition Scoring, sowie einer Lahmheitsuntersuchung unterzogen. Für das Body Condition Scoring wurde jedes einzelne Tier anhand bestimmter Knochenvorsprünge (u.a. Hüftknochen, Lendenwirbel) beurteilt und in Kategorien von 1 = stark unterernährt bis 5 = stark überfüttert eingeteilt. Ebenfalls wurde

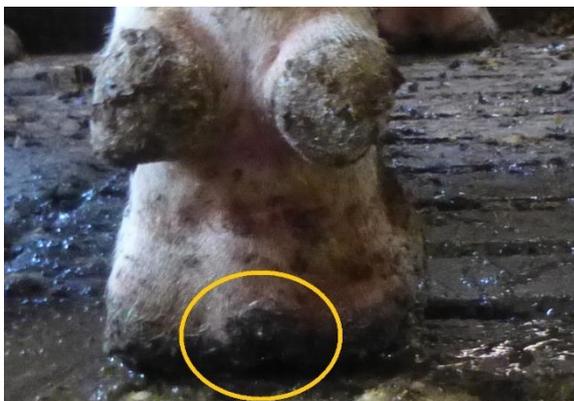
jedes Tier in seiner Bewegungsabfolge beobachtet und in Lahmheitsgrade 1 = ungestörter Bewegungsablauf bis 4 = chronische Lahmheit (5 = nicht zu beurteilen) eingeteilt. Zur Dokumentation der anschließenden *DD*-Diagnostik und zum Festhalten des Ist- Zustandes wurden Fotos von Rinderklauen mit Verdacht auf *DD* gemacht und die Tiere vermerkt, damit anhand derer der Verlauf und die Entwicklung der *DD* untersucht werden konnte.



**Foto 1:** Begutachtung der Milchkühe in Hinblick auf Lahmheit (vermehrtes Liegen) und Body Condition Score.



**Foto 2:** Begutachtung der Liegeplätze und des Stallbodens bezüglich der Hygiene im Stall.



**Foto 3**



**Foto 4**

**Foto 3/4:** *Dermatitis digitalis*-Beurteilung. Foto 3 zeigt eine Klaue mit Verdacht auf *Dermatitis digitalis*, da der Zwischenklauenspalt, aufgrund einer Proliferation des Gewebes kaum erkennbar ist. Foto 4 hingegen zeigt eine unveränderte Klaue mit schön erkennbarem Zwischenklauenspalt.

#### **2.4.4. Beitrag des Ergebnisses zu förderpolitischen EIP-Themen**

Die Operationelle Gruppe „PlaWaKiRi - Der Einsatz von Plasmawasser gegen Klaueninfektionen beim Rind“ adressiert im Projekt mehrere der förderpolitischen EIP-Themen. Entsprechend der Richtlinie wird das Plasmawasser als innovative Technologie als Ansatz gewählt, eine Alternative zur Antibiotika-Therapie der *Dermatitis digitalis* zu erforschen. Unter Einbindung eines landwirtschaftlichen Betriebes wird hier der Weg der Innovation in die praktische Anwendung vorbereitet. Angesichts der bisherigen Erkenntnisse sind bereits vielversprechende Ansätze, insbesondere hinsichtlich der antimikrobiellen Wirkung des Plasmawassers erkennbar. Dennoch besteht noch umfassender Forschungsbereich, bis diese innovative Technologie am Tier selbst angewendet werden kann. Die Arbeitspakete des PlaWaKiRi-Projektes wurden neu ausgerichtet, sodass über die weitere Erforschung der Wirkweise und möglicher Einflussfaktoren die Basis für spätere Versuche am Tier und beim Landwirt- Stichwort: Stall der Zukunft- geebnet werden. Hier kommt auch dem landwirtschaftlichen OG-Partner im Austausch eine relevante Rolle zu.

Mit Bezug zu den niedersächsischen Themenschwerpunkt kommt hauptsächlich der Bereich der Tiergesundheit zum Tragen, der als Initiator für das Projekt im Mittelpunkt steht. Der Reduktion oder dem Verzicht auf eine notwendige Antibiotikabehandlung wird durch die Versuchsansätze, die gewählten Tierhautoberflächen und die selektierten Mikroorganismen begegnet. Grundsätzlich gewinnt die Anwendung dieser ressourcenschonenden Plasma-Technologie angesichts der wirtschaftlich zum Teil angespannten Situation von Interesse für die konventionell und gleichfalls auch für die ökologisch wirtschaftenden Betriebe.

#### **2.4.5. Nebenergebnisse**

Unter Berücksichtigung der ursprünglichen Antragsstellung konnten durch die Neuausrichtung in den APs B3 und B4 auch Erkenntnisse über die Anwendung des Tb-PAWs auf Haut der Spezies Geflügel (Huhn, Ente) und Schwein gesammelt werden. Diese sind in den Abschnitten 2.1.1.2. Arbeitspaket B2 „Versuche mit Rinderklauenhaut mit Zwischenschritten auf Tierhäuten der Spezies Schwein und Geflügel “ und 2.4.3.2. Arbeitspaket B2 „Versuche mit Rinderklauenhaut mit Zwischenschritten auf Tierhäuten der Spezies Schwein und Geflügel “ dargestellt. Diese Erweiterungen im Projekt bildet die Basis für ein weiteres EIP Agri-Projekt, welches u.a. für die OG-Partner 1 und 2 bereits erfolgreich bewilligt werden konnte.

#### **2.4.6. Arbeiten, die zu keinem Ergebnis geführt haben**

Innerhalb der Arbeitspakete des OG-Partners 2 sind keine Arbeiten offengeblieben. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es infolge der Erkenntnisse aus AP B1 und B2 zu einer Änderung der APs B3 und B4 gekommen ist, wie unter 2.1.1. „Gegenüberstellung Geschäftsplan und tatsächlich durchgeführte Teilschritte“, sowie 2.4.1. „Zielerreichung“ bereits dargelegt wurde. Gegenüber dem Ursprungsantrag sind demnach keine Aussagen über die Verträglichkeit des Tb-PAWs am gesunden, lebenden Tier und über die Umsetzbarkeit der Anwendung im landwirtschaftlichen Betrieb mit DD-betroffenen Tieren möglich.

#### **2.4.7. Mögliche weitere Verwendung von Investitionsgütern**

In diesem Projekt wurden keine Investitionskosten beantragt, daher stehen keine Investitionsgüter zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

#### **2.5. Nutzen der Ergebnisse für die Praxis**

Die gewonnenen Erkenntnisse aus dem Projekt PlaWaKiRi stellen eine vielversprechende Grundlage für die weitere Vorbereitung der Anwendung von Tb-PAW auf Tierhäuten und auch zur Behandlung von Rindern mit DD dar. Es wurden wichtige Erfahrungen über die Lagerung, den Einfluss der Temperatur, die Herstellungsbedingungen des Tb-PAWs allgemein und die Applikationsmöglichkeiten gesammelt. Auch Herausforderungen durch die komplexe Matrix der (Rinder-)Haut wurden festgestellt und es wurde ihnen entsprechend in experimentellen Ansätzen begegnet. Aufgrund der angepassten Neuausrichtung der AP B3 und B4 liegen wichtige Ergebnisse vor, die bei einer späteren Antragstellung für einen Tierversuch hilfreich sind. Während der Projektlaufzeit gab es bereits Interesse aus der Praxis, wobei auch zu berücksichtigen ist, dass während der Covid19-Pandemie nur wenig persönliche Multiplikation auf Messen und Tagungen möglich gewesen ist. Seitens der Tierärzteschaft wurde über die Fachzeitschrift „Der Praktische Tierarzt“ bereits angefragt und ein einführender Artikel zur Thematik abgedruckt. Es ist davon auszugehen, dass auch nach Projektabschluss ein entsprechender Bericht dazu publiziert werden wird.

#### **2.6. Verwertung und Nutzung der Ergebnisse**

Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen zunächst den Ansatz, Tb-PAW auf Tierhaut zur Verringerung der Keimzahlen einzusetzen. Sie bilden eine wichtige Basis für später notwendige Tierversuche, die vor einer praktischen Anwendbarkeit des Tb-PAWs genehmigt und durchgeführt werden müssen. Es gibt bereits ein gewachsenes Bewusstsein für die Möglichkeiten einer Tb-PAW-Anwendung im Kontext des Projektes. Die Ergebnisse wurden u.a. im Kontext der Lebensmittelwissenschaften und der Tierärzteschaft vorgestellt und publiziert. Auf Basis der Erkenntnisse des APs B2 fußt darüber hinaus auch ein bewilligtes und aktuell laufendes EIP-Projekt zur kombinierten Anwendung verschiedener

Dekontaminationsverfahren auf Schlachttierkörperoberflächen und Teilstücken bei Schwein und Geflügel (DEALS.).

## **2.7. Wirtschaftliche und wissenschaftliche Anschlussfähigkeit**

Die wirtschaftliche Anschlussfähigkeit im Hinblick auf die Tb-PAW-Behandlung von Rindern mit DD ist als gut einzustufen. Aufgrund der Häufigkeit der Erkrankungen bei den Tieren und der hohen Relevanz für die Abgänge aus den Beständen, besteht ein deutlich erkennbarer Bedarf an alternativen Behandlungsmethoden. Insbesondere vor dem Hintergrund der Antibiotikaminimierungsstrategie ist das Tb-PAW sehr attraktiv und die Ergebnisse des Projektes zur Keimreduktion *in vitro* vielversprechend. Die wissenschaftliche Anschlussfähigkeit an das Projekt PlaWaKiRi ist in hohem Maße gegeben. Auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse können weitere Untersuchungen angeschlossen werden, die die Anwendung des Tb-PAWs am Tier vorbereiten. Weiterhin haben sich vielfältige weitere assoziierte Anschlussmöglichkeiten eröffnet, die u.a. im EIP-Projekt DEALS verfolgt werden. Zukünftige Projekte können sich u.a. mit der Lagerfähigkeit des Tb-PAWs in den landwirtschaftlichen Betrieben, mit dem Mode of action der Wirkung an sich, mit der Verträglichkeit im Tierversuch und mit verschiedenen Applikationsformen befassen. Im Hinblick auf die hohe Variabilität der Anwendungsmöglichkeiten können sich hier vielfältige Fragestellungen anschließen.

Weitere Anschlussprojekte im Bereich der Hygiene bzw. allgemein der mikrobiziden Wirkung von PAW sind in der Planungs- bzw. Einreichungsphase. Die im Projekt erzielten Ergebnisse aus den genannten Themenbereichen haben mittel- und langfristig ein erhebliches Potential für Drittmittelprojekte mit Industriebeteiligung, sodass mit der thematischen Weiterführung in den nächsten 5 Jahren zu rechnen ist. Das durch das Forschungsvorhaben entstandene Know-how auf dem Gebiet der Herstellung und Anwendung von PAW ermöglicht eine nachhaltige Weiterführung der Erschließung möglicher Applikationen. Der Transfer der Ergebnisse erfolgt akademisch durch das Verfassen von Publikationen in Fachzeitschriften sowie Vorträgen auf Fachtagungen und Seminaren. Des Weiteren können die aus dem EIP-Projekt gewonnenen Erkenntnisse für Forscher und Anwender von Nutzen sein, die auf dem Gebiet der Plasmatechnologie und der Veterinärmedizin bzw. der Humanmedizin & Hygiene tätig sind.

## 2.8. Kommunikations- und Disseminationskonzept

Für die Verbreitung der Durchführung und der Ergebnisse des Projektes wurden unterschiedliche Kommunikationswege genutzt:

Wissenschaftliche Publikationen:

1. Große-Peclum V, Siekmann L, Krischek C, Avramidis G, ten Bosch L, Harms M, Ochs C, Ortmann R, Hoedemaker M, Ahlfeld B, Roolfs KA, Viöl W, Plötz M. (2022): **An In Vitro Model Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms Involved in Digital Dermatitis Infection in Cattle** Applied Sciences. 2022; 12(23):12325. <https://doi.org/10.3390/app122312325>
2. Große-Peclum V, Siekmann L, Krischek C, Avramidis G, Ochs C, Viöl W, Plötz M. (2023): **Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms on Poultry Carcasses with Evaluation of Physicochemical and Sensory Parameters** Foods. 2023; 12(5):1113. <https://doi.org/10.3390/foods12051113>

Weitere Veröffentlichungen:

1. Große-Peclum V., Siekmann L., Krischek C., Plötz M. (2021): Die Wirksamkeit von plasma-aktiviertem Wasser auf ausgewählte Keime mit Bezug zur Dermatitis digitalis beim Rind (Material und Methoden)  
Vortrag am 20.01.2021 im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
2. Große-Peclum V., Siekmann L., Ahlfeld B., Krischek C., Hoedemaker M., Avramidis G., Plötz M. (2021): Die Wirksamkeit von plasma-aktiviertem Wasser auf bestimmte Mikroorganismen mit Bezug zur Dermatitis digitalis beim Rind  
Posterbeitrag bei der 61. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Garmisch-Partenkirchen
3. Große-Peclum V., Siekmann L., Krischek C., Avramidis G., Plötz M. (2022): Einsatz von plasma-aktiviertem Wasser zur Reduktion pathogener Keimbelastung auf Geflügelhaut  
Posterbeitrag bei der 62. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Garmisch-Partenkirchen
4. Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Abteilung Lebensmitteltechnologie und –chemie und die Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule und die Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst, Fakultät

Ingenieurwissenschaften und Gesundheit (2022): „Plasma-aktiviertes Wasser als Chance zur Antibiotikareduktion“. Der Praktische Tierarzt 103 (04), S. 324.

5. Große-Peclum V., Siekmann L., Krschek C., Plötz M. (2023): Einsatz von plasma-aktiviertem Wasser zur Reduktion pathogener Keimbelastung auf Hautoberflächen verschiedener Tierspezies (Ergebnisse)  
Vortrag am 16.02.2023 im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

## **Anhänge**

- I Schreiben an Borchardt GBR
  
- II An In Vitro Model Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms Involved in Digital Dermatitis Infection in Cattle
  
- III Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms on Poultry Carcasses with Evaluation of Physicochemical and Sensory Parameters



Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder,  
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Markus Borchardt  
In der Bülte 7  
37115 Duderstadt

**Klinik für Rinder**

Direktorin:  
**Prof. Dr. Martina Hoedemaker, PhD**  
Bischofsholer Damm 15  
30173 Hannover  
Tel.: +49 511 856-7246  
Fax: +49 511 856-7693

Arbeitsbereich Bestandstiermedizin  
**Dr. Svenja Kallmeyer**  
Tel.: +49 511 856-7411  
svenja.kallmeyer@tiho-hannover.de

Ihre Nachricht vom | Ihr Zeichen

Meine Nachricht vom | Mein Zeichen

Datum  
Hannover, 11.08.2023

Sehr geehrter Herr Borchardt,

nachdem im Rahmen des Projektes „PlaWaKiRi – der Einsatz von Plasmawasser gegen Klaueninfektionen beim Rind“ beim Herdenschnitt im Januar 2022 durch uns eine hohe Prävalenz an Dermatitis digitalis-Läsionen (DD-Läsionen) bei Ihren Milchkühen festgestellt wurde, haben wir anhand der auf Ihrem Betrieb identifizierten Risikofaktoren Maßnahmen empfohlen, um die Erkrankungshäufigkeit zu reduzieren. In der Besprechung am 25.07.2023 haben Sie uns über deren Umsetzung bzw. Ihr aktuelles Klauengesundheitsmanagement informiert:

Nach einer halbjährigen Testphase im vergangenen Jahr haben Sie für das HL-Abteil (frischabgekalbte und hochleistende Kühe bis zur erneuten Belegung) einen Spaltenschieberoboter angeschafft. Laut eigener Aussage sind die Unterbeine und auch die Liegeboxen durch die Inbetriebnahme des Roboters deutlich sauberer. Für die Haut im Bereich der Unterfüße bedeutet das, dass sich die Phasen, in denen die Haut durch Gülle angegriffen wird, verkürzen und ihre Barrierefunktion erhalten bleiben kann. Wichtig ist, dass auch im NL-Abteil (besamte und spätlaktierende Kühe, planbefestigter Boden) die Hygiene durch trockenere Laufgänge verbessert wird, d. h., dort müssen die Frequenz des automatischen Gülleschiebers angepasst und die Quergänge regelmäßig von Hand abgeschoben werden. Seit Dezember 2022 erfolgt der dreimal jährliche Herdenschnitt durch Christian Siebert (M und C Klauenpflege). Herr Siebert dokumentiert seine Befunde und Diagnosen mit dem Software-Programm Klaue (dsp agrosoft). Im Arbeitsnachweis vom 20./21.12.2022 sind 48 DD-Läsionen erfasst; diese Diagnosehäufigkeit entspricht grob den 32 DD-M2-Läsionen, die von uns im Januar desselben Jahres diagnostiziert wurden. Beim zweiten Herdenschnitt durch Herrn Siebert (26./27.04.2023) wurden nur noch 11 DD-Diagnosen gestellt. Im Unterschied zu früher werden DD-Läsionen jetzt mit Blauspray behandelt, stark betroffene Klauen werden zusätzlich unter Verband genommen. Am Tag nach der Klauenpflege laufen die Tiere weiterhin einmalig durch ein Klauenbad. Als Biozid kommt inzwischen Formalin zum Einsatz. Aus unserer Sicht sind das Timing und die Anwendungshäufigkeit des Klauenbades nicht optimal. Tiere, die vom Klauenpfleger einen Verband bekommen haben, sollten nicht durch das Bad laufen, so dass ein entsprechender zeitlicher Abstand zwischen Klauenpflege und Klauenbad eingehalten werden sollte, sofern diese Tiere nicht vom Klauenbad ausgeschlossen werden. Damit das

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
Klinik für Rinder  
Bischofsholer Damm 15  
30173 Hannover

Bankverbindung  
Norddeutsche Landesbank Hannover  
IBAN: DE98 2505 0000 0106 0311 64  
SWIFT-BIC: NOLA DE 2H  
Steuer-Nr.: 25/202/26506  
Ust-ID-Nr.: DE 233060166

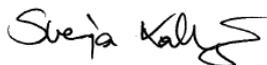
Klauenbad den Keimdruck längerfristiger reduzieren kann, ist eine wiederholte Anwendung (mehrmals pro Woche) nötig, dabei ist auf die korrekte Anwendung zu achten [Konzentration der anzuwendenden Lösung nach Herstellerangaben, Wechsel der Lösung nach 200 Tieren, Temperatur (Formalin nicht bei  $<10$  °C lagern/anwenden)]. Wichtiger als die Klauenbadanwendung ist die frühzeitige Therapie akuter DD-Läsionen im M2-Stadium. Dementsprechend sollten betroffene Tiere nicht nur an den Herdenschnittterminen behandelt werden. Zweckmäßigerweise sollten die geschädigten Stellen gereinigt, mit einem Tetrazyklinspray versorgt (2 Sprühstöße im Abstand von 30 sec) und mit einem Verband abgedeckt werden. Nach 7 Tagen ist der Verband abzunehmen und das Procedere ggf. zu wiederholen. Alternativ zum Tetrazyklinspray kann auch eine salicylsäure-haltige Salbe angewendet werden, um die hyperkeratotischen Hautbezirke abzulösen. Um erkrankte Tiere zu identifizieren, ist es sinnvoll, eine Screening-Routine zu etablieren (bspw. ein- bis zweimal monatlich während einer Melkzeit die Klauen mittels Spiegel untersuchen). Sowohl in das Screening als ggf. auch in die Behandlung sind die Färsen miteinzubeziehen. Derzeit ist geplant, die tragenden Färsen, wenn sie nach der Weidesaison wieder aufgestellt werden, einer Klauenbad- bzw. Sprayanwendung zu unterziehen und die mit Gummimatten ausgelegten Stand- und Liegeplätze (Anbindehaltung) zusätzlich mit einer dünnen Schicht eines Kalk-Stroh-Gemisches einzustreuen, um bei erhöhtem pH-Wert die Feuchtigkeit zu binden.

Bei der initialen Bestandsdiagnostik ergab die Analyse der MLP-Daten, dass zwischen 15 und 25 % der laktierenden Kühe energetisch unterversorgt waren, folglich wurde eine Erhöhung der Futtermenge empfohlen. Durch die Möglichkeit weitere 18 ha Grünland zu bewirtschaften, kann inzwischen ausreichend Grassilage erzeugt werden, um eine TMR bestehend aus je 25 kg Gras- und Maissilage zu füttern. Weitere Bestandteile der Ration sind Soja, Raps, Körnermais und Gerste; Biertreibersilage wird nicht mehr eingesetzt. Die genaue Rationszusammensetzung bzw. die aktuelle Rationsberechnung liegen uns nicht vor. Ebenso wenig die MLP-Daten der letzten 3 Monate, so dass auch keine indirekte Fütterungsanalyse vorgenommen werden kann. Da es in Ihren beiden Stallabteilen für die laktierenden Kühe je nach Belegungssituation zumindest hinsichtlich des Tier-Fressplatz-Verhältnisses zu Überbelegung kommen kann, sei nochmals darauf hingewiesen, dass der ständige Zugang zum Grundfutter (ausreichende Menge vorlegen, mehrfach täglich anschieben) essenziell ist und dass das gelegentliche Wiegen der Futterreste eine nützliche Maßnahme der Rationsüberprüfung darstellt.

Wir hoffen, Ihnen mit dieser kurzen Darstellung ein hilfreiches Feedback zu Ihrem Klauengesundheitsmanagement zu geben. Die Bekämpfung der Dermatitis digitalis ist ein langer Weg und durch Belastungssituationen wie Hitzestress und Ähnliches kann es zu einem Wiederaufflammen der Symptomatik kommen. Lassen Sie sich davon nicht demotivieren, sondern kontrollieren Sie die Wirksamkeit Ihrer Maßnahmen und bleiben Sie am Ball. Sie können sich jederzeit mit Rückfragen an uns wenden.

Abschließend bedanke ich mich im Namen des Arbeitsbereichs Bestandstiermedizin der Klinik für Rinder für Ihr Vertrauen und verbleibe

mit freundlichen Grüßen



Svenja Kallmeyer

## Article

# An In Vitro Model Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms Involved in Digital Dermatitis Infection in Cattle

Vanessa Große-Peclum <sup>1</sup>, Lisa Siekmann <sup>1,\*</sup>, Carsten Krischek <sup>1</sup>, Georg Avramidis <sup>2</sup> , Lars ten Bosch <sup>2</sup> , Marcus Harms <sup>2</sup>, Christian Ochs <sup>2</sup>, Rinat Ortmann <sup>2</sup>, Martina Hoedemaker <sup>3</sup>, Birte Ahlfeld <sup>1</sup>, Karolina Anna Roolfs <sup>1</sup>, Wolfgang Viöl <sup>2</sup>  and Madeleine Plötz <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, 30173 Hannover, Germany

<sup>2</sup> Faculty Engineering and Health, University of Applied Sciences and Arts, 37085 Göttingen, Germany

<sup>3</sup> Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, 30173 Hannover, Germany

\* Correspondence: lisa.siekmann@tiho-hannover.de; Tel.: +49-511-856-7314

**Abstract:** Bovine digital dermatitis is an important infectious claw disease caused by multimicrobial infections with bacteria such as *Fusobacterium (F.) necrophorum* or *Porphyromonas (P.) levii*. To analyze the antibacterial effects of a TRIS-buffered plasma-activated water (Tb-PAW) on the bacterial number of *F. necrophorum*, *P. levii*, *Escherichia (E.) coli*, *Staphylococcus (S.) aureus* and *Clostridium (C.) sporogenes* 1 mL of each bacterial solution ( $10^6$ – $10^8$  CFU/mL) was incubated with 9 mL Tb-PAW up to 15 min. *E. coli*, *F. necrophorum* and *P. levii* were significantly reduced by 5.0 log after 1 min of treatment, while *S. aureus* and *C. sporogenes* required 15 min to reach a 3.0 log reduction. The addition of bovine serum albumin did not negatively affect the bactericidal effect. Tb-PAW storage at 7 °C and 21 °C is possible for up to 24 h without any change in the bactericidal effect, while Tb-PAW stored at 30 °C can only be used for a period of 12 h. The present data indicate that Tb-PAW can be used to reduce various bacteria even under the influence of different parameters. However, due to the complexity of Tb-PAW, further studies are required to ensure its microbicidal activity before practical application.

**Keywords:** digital dermatitis; plasma-activated water; cold plasma; TRIS-buffer; microbial disinfection; *Fusobacterium necrophorum*; *Porphyromonas levii*



**Citation:** Große-Peclum, V.; Siekmann, L.; Krischek, C.; Avramidis, G.; ten Bosch, L.; Harms, M.; Ochs, C.; Ortmann, R.; Hoedemaker, M.; Ahlfeld, B.; et al. An In Vitro Model Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms Involved in Digital Dermatitis Infection in Cattle. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12325. <https://doi.org/10.3390/app122312325>

Academic Editor: Francisco Arrebola

Received: 11 November 2022

Accepted: 29 November 2022

Published: 2 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Bovine digital dermatitis (DD) is a claw disease in cattle which often causes lameness due to painful lesions. These lesions are characterized by erosive ulcerations often presented as moist, circular, strawberry-like structures with long hair surrounding them [1,2]. The reduced cattle welfare is reflected in decreased milk yield, lower body condition scores, poor reproductive performances and increased losses due to early culling [3,4]. DD has a multifactorial etiology. Causative factors, leading to pre-damage of the skin are manifold. These are e.g., unhygienic stable conditions, slatted floors without scrapers, as well as standing in wet manure, which allow the infiltration of pathogens [2,5,6]. In particular, pathogenic bacteria, including *Treponema* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Porphyromonas levii*, Mycoplasmataceae, *Escherichia coli* and staphylococci are considered to play an important role in the development of DD [2,6–10].

For decades, the treatment of DD has been a major challenge. Research is still being conducted on treatment alternatives to the current commonly used systemic or topical antibiotic applications. Oxytetracycline or lincomycin are often used as a topical therapy whereas erythromycin is frequently used for group treatments with footbaths [2,11,12]. In addition, the use of antibiotics causes economic losses for farmers, due to the transient prohibition of milk delivery and meat production [13]. Novel insights into the treatment

of DD show that non-antibiotic agents also have a beneficial effect on the lesions. These include formaline, copper sulfate, dragonhyde or phenytoin, but these chemicals often have environmentally damaging potentials [13–15].

It is important to reduce the existing pathogenic organisms involved in DD to achieve prevention or effective healing of the specific lesions. Plasma-activated liquids (PAL) may provide an antibiotic-free option to minimize pathogens and prevent or at least mitigate DD. A wide variety of PALs are now being produced and studied for their antimicrobial activity. Plasma-activated water (PAW) is made from pure distilled water, whereas various buffers are used to produce plasma-activated buffers for example phosphate buffered saline (PBS) or citrate-phosphate buffer [16,17].

Nowadays, PAW in particular is used in a variety of ways, for example in microbiology for bacterial reduction or in medicine for wound healing, treatment of skin diseases or cancer therapy [18–21], even insecticidal effects of PAW have been demonstrated [22]. PAW contains various reactive oxygen species (ROS), as well as reactive nitrogen species (RNS). ROS include hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxyl radicals ( $\text{OH}^-$ ) or superoxides ( $\text{O}_2^-$ ), whereas peroxyxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) and nitrogen dioxide ( $\text{NO}_2^-$ ) radicals belong to the RNS [23–25]. It has been widely documented that these reactive species can damage the microorganisms at various cell components and thus inactivate them. For example, Yusupov et al. [26] found that oxidative stress can break the cell wall due to the destruction of peptide-glycan bonds. Similarly, it was shown by Chen et al. [27] that after intracellular entry of reactive species, both DNA and proteins in the bacterial cell were destroyed.

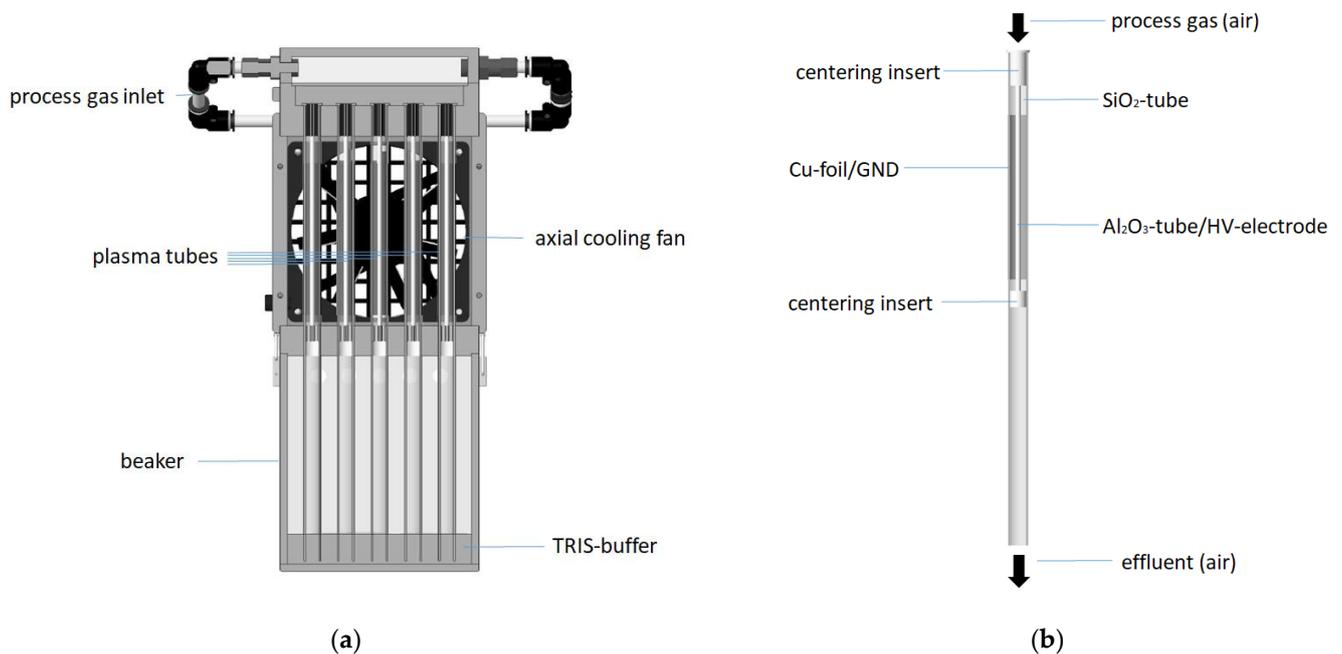
In this study, we investigated the influence of a TRIS-buffered PAW (Tb-PAW) on Gram-positive and Gram-negative aerobic, as well as anaerobic microorganisms associated with DD and frequently found on the claw or in the stable, using an *in vitro* model. These investigations were followed by an analysis of specific factors influencing the antimicrobial effectivity of the Tb-PAW, such as proteins, temperature or storability. The aim of the research was to evaluate the microbicidal activity of Tb-PAW for its applicability in an agricultural facility to reduce pathogenic microorganisms under various conditions, thus providing an alternative therapy or prophylaxis for the management of DD in the stable.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plasma Device and Production of Tb-PAW

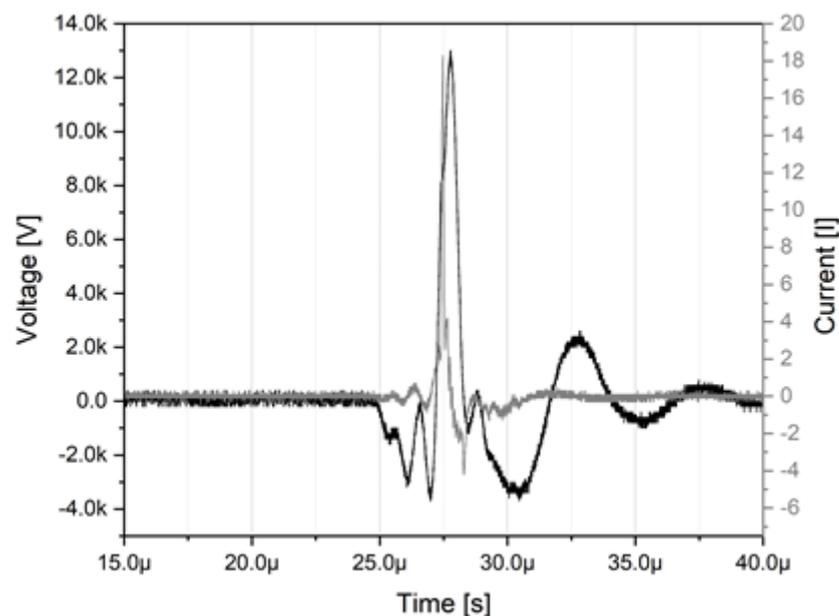
The Tb-PAW was produced by the faculty of engineering and health (HAWK, University of Applied Science and Arts, Göttingen, Germany) using an in-house development of the HAWK for the production of Tb-PAW based on the principle of a double-insulated DBD discharge. The complete setup for the generation of Tb-PAW consists of an arrangement of 10 individual “plasma tubes” which are integrated into an array ( $2 \times 5$ ) in a corresponding assembly (see Figure 1a).

The single plasma tube consists of an outer radially symmetrical silica tube (total length 300 mm, outer diameter 12 mm inner diameter 10 mm), wrapped with Cu-foil, which serves as the ground electrode (GND), and a centrally positioned ceramic tube ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (Figure 1b). The ceramic tube has an outer diameter of 3 mm, an inner diameter of 1.6 mm and is filled with a brass rod (diameter 0.8 mm), the cavities are filled with brass powder. The ceramic tube acts as the high-voltage electrode. The chosen geometry results in a discharge gap of approx. 3.5 mm, which has a discharge length of approx. 100 mm. The discharge gap is streamed with pressure air as process gas at a gas volume flow rate of  $5 \text{ Lmin}^{-1}$ . This results in an average exposition time of the air to the discharge conditions of  $\approx 0.1 \text{ s}$ . The outer quartz tube protrudes approx. 5 cm into a beaker filled with deionized water. The distance between the end of the discharge section and the water surface is approx. 160 mm, so that the plasma exhaust contacts water after approx. 0.15 s after exiting the plasma zone.



**Figure 1.** (a) Scheme of the plasma tube array to generate Tb-PAW (b) Scheme of the single plasma tube.

The high voltage power supply provides alternating pulses ( $U = 16.6$  kV peak-peak) with a pulse repetition frequency of 17 kHz, a pulse duration of approx.  $2 \mu\text{s}$ , an in-coupled power of approx. 400 W and a power density of approx.  $6 \text{ W}/\text{cm}^3$  to the plasma-array. The characteristic U-I-envelope of the plasma source is depicted in Figure 2.



**Figure 2.** U–I-characteristics of the plasma source at a power of approx. 400 W.

The goal was to achieve a neutral pH-value of the Tb-PAW to allow an application on living animals in the future. Thus, TRIS-buffer (0.5 mol/L), made with TRIS(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS, Trometamol,  $\geq 99.8\%$ , VWR International, Darmstadt, Germany) and TRIS-HCl (TRIS(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid,  $\geq 99.0\%$ , VWR), were treated with the plasma source for 20 min to obtain 250 mL Tb-PAW. The Tb-PAW and the (untreated, control) TRIS-buffer were transported at room temperature within 4 h

after preparation to the Institute for Food Quality and Food Safety (LMQS, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany). The experiments started within 4 to 5 h after preparation of the Tb-PAW. At first, the pH-values of the TRIS-buffer control ( $7.6 \pm 0.2$ ) and the Tb-PAW sample ( $7.3 \pm 0.2$ ) were measured with a pH-meter (Jenway, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, ST15 OSA, UK) equipped with a glass electrode (InLab Semi-Micro, Mettler Toledo, Gießen, Germany). For the experiments, the pH-values of all TRIS-buffer samples were adjusted to the respective pH-value of the Tb-PAW in order to exclude a pH-effect. Additionally, prior to the transport to the LMQS a Reflectoquant (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used to measure the concentrations of nitrate anions ( $\text{NO}_3^-$ ; approx. 5540 mg/L) and nitrite anions ( $\text{NO}_2^-$ ; approx. 440 mg/L), as well as hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; approx. 4.5 mg/L) concentrations in the Tb-PAW.

## 2.2. Bacterial Strains and Culture Conditions

*Escherichia (E.) coli* (DSM 682), *Staphylococcus (S.) aureus* (DSM 799, MSSA reference strain), *Fusobacterium (F.) necrophorum* (DSM 21784), *Porphyromonas (P.) levii* (DSM 23370), and *Clostridium (C.) sporogenes* were selected for the experiments, whereas *Treponema* spp. was left out because it is more difficult to cultivate. The bacterial strains *E. coli* (origin unknown), *S. aureus* (isolated from a human lesion) and the two anaerobes *F. necrophorum* (isolated from a bovine hepatic abscess) and *P. levii* (isolated from bovine rumen) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany). *C. sporogenes* was taken from an own stock (originated from a milk sample from an older test series) of the LMQS. *E. coli*, *S. aureus* and *C. sporogenes* were plated on Columbia blood agar with sheep blood (Oxoid GmbH, Wesel, Germany). *F. necrophorum* and *P. levii* were plated on Schaedler Anaerobic Agar with Sheep Blood, Haemin and Vitamin K 1 (Oxoid GmbH, Wesel, Germany). The incubation period for *E. coli* and *S. aureus* was 24 h, for *C. sporogenes* and *P. levii* 48 h and for *F. necrophorum* 72 h. All microorganisms were incubated at 37 °C. During incubation *F. necrophorum*, *P. levii* and *C. sporogenes* were kept in an anaerobic jar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with resazurin anaerobic indicator paper (Oxoid GmbH, Wesel, Germany) and AnaeroGen 3.5 L bags (Oxoid GmbH, Wesel, Germany). At each experiment, to prevent negative effects of the oxygen, the latter bacteria strains were exposed to air for a maximum of 30 min before the transfer to the anaerobic environment. For safekeeping of the bacterial strains, colonies of each bacterial strain were transferred to a separate cryotube (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and frozen at  $-80$  °C. Before starting the experiments, one bead from each cryotube was spread onto a blood agar plate and grown as described above.

## 2.3. Tb-PAW Treatment on Different Bacterial Strains

All microbiological tests were performed in accordance with ISO-16649-2 and ISO-11290-2. For each bacterial strain, 9 mL Tb-PAW and 9 mL TRIS-buffer were added to sterile test tubes. The untreated TRIS-buffer was used as a control. Bacterial colonies were suspended in sterile saline (0.9% NaCl) and adjusted to McFarland turbidity standards of 1.5 (*E. coli*, *S. aureus*, *C. sporogenes*), 2.0 (*P. levii*), and 3.0 (*F. necrophorum*) to achieve a concentration of the colony forming units (CFU) of approx.  $10^7$ – $10^8$  CFU/mL ( $10^6$  CFU/mL for *C. sporogenes*). One mL of each bacterial suspension was added to the Tb-PAW and TRIS-buffer samples (final concentrations of  $10^6$ – $10^7$  CFU/mL resp.  $10^5$  CFU/mL), mixed and incubated at room temperature for 1 min. In addition, *S. aureus* and *C. sporogenes* were incubated for 5 min and 15 min. Serial dilutions were performed by adding 1 mL of the sample solution to 9 mL of sterile saline solution containing peptone-buffered water (0.85% NaCl, 0.1% peptone, VWR). To identify the surviving bacteria, 100  $\mu\text{L}$  of the appropriate dilution stage was spread in duplicate on selective agar plates (Oxoid, GmbH, Wesel, Germany). Colic Brilliance™ *E. coli*/Coliform selective agar (ColiC agar) was used for *E. coli*, Baird–Parker agar for *S. aureus*, Tryptose Cycloserine Agar for *C. sporogenes* and Schaedler Anaerobic Agar with Sheep Blood, Haemin & Vitamin K 1 (Schaedler agar) for *F. necrophorum* and *P. levii*. The agar plates were incubated as described above.

#### 2.4. Application of BSA as a Protein Factor

For analysis of the effect of protein addition *E. coli*, *F. necrophorum* and *P. levii* were used, due to their significant reductions in the previous experiment after one minute (see Section 3.1). For the experimental setup, the final solution was adjusted to contain a concentration of approx. 5% BSA and a bacteria number of approx.  $10^6$ – $10^7$  CFU/mL. Thus, the McFarland turbidity standard was adjusted to 3.0 (*E. coli*), 4.0 (*P. levii*) and 6.0 (*F. necrophorum*). For the samples with 5% BSA, 1.66 mL of a 30% BSA solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.5 mL of the bacterial strains were each added to separate sterile test tubes. After the addition of 7.84 mL Tb-PAW, the samples were vortexed and incubated for one minute at room temperature. Then, 1 mL of the solution was added to 9 mL sterile saline solution containing peptone-buffered water (0.85% NaCl, 0.1% peptone, VWR) and again a dilution series were performed. Subsequently 100  $\mu$ L of the appropriate dilutions were spread in duplicate on ColiC (*E. coli*) and Schaedler agar (*P. levii*, *F. necrophorum*). The agar plates were incubated and evaluated as described in Section 2.2 and Section 2.6. As controls, the Tb-PAW was replaced with untreated TRIS-buffer. As the 30% BSA solution contained sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) for preservation, additional control samples were run including 0.1%  $\text{NaN}_3$  (as an equivalent for 5% BSA) and Tb-PAW.

#### 2.5. Tb-PAW Storage Trials at Different Temperatures

The effect of different storage temperatures and time periods on the antimicrobial properties of the Tb-PAW were analyzed 4, 8, 12 and 24 h after preparation at 7 °C, 21 °C, and 30 °C emulating different weather conditions. In four independent experiments 9 mL of Tb-PAW was placed in 12 sterile test tubes and stored in a 30 °C incubator, in a refrigerator at 7 °C and at room temperature in a cabinet. All samples were kept in the dark. Immediately before the measurement points of time, the *E. coli* concentration was adjusted to  $10^7$ – $10^8$  CFU/mL using McFarland turbidity standards. Subsequent to addition of 1 mL of bacterial suspension the Tb-PAW test samples, were mixed and incubated for 1 min and analyzed as described in Section 2.3. An identical number of 9 mL TRIS-buffer controls were investigated.

#### 2.6. Bacterial Enumeration

To perform a colony count assay, all agar plates showing up to 300 colonies were included in the scoring. In case of shortfall of bacterial counts below the detection limit of 10 CFU/mL (*E. coli*) and 100 CFU/mL (all other bacteria) bacteria numbers of 5 CFU/mL (*E. coli*) and 50 CFU/mL (all other bacteria) were considered for the statistical analysis. Results are expressed in common logarithm of CFU/mL.

#### 2.7. Statistical Analysis of the Data

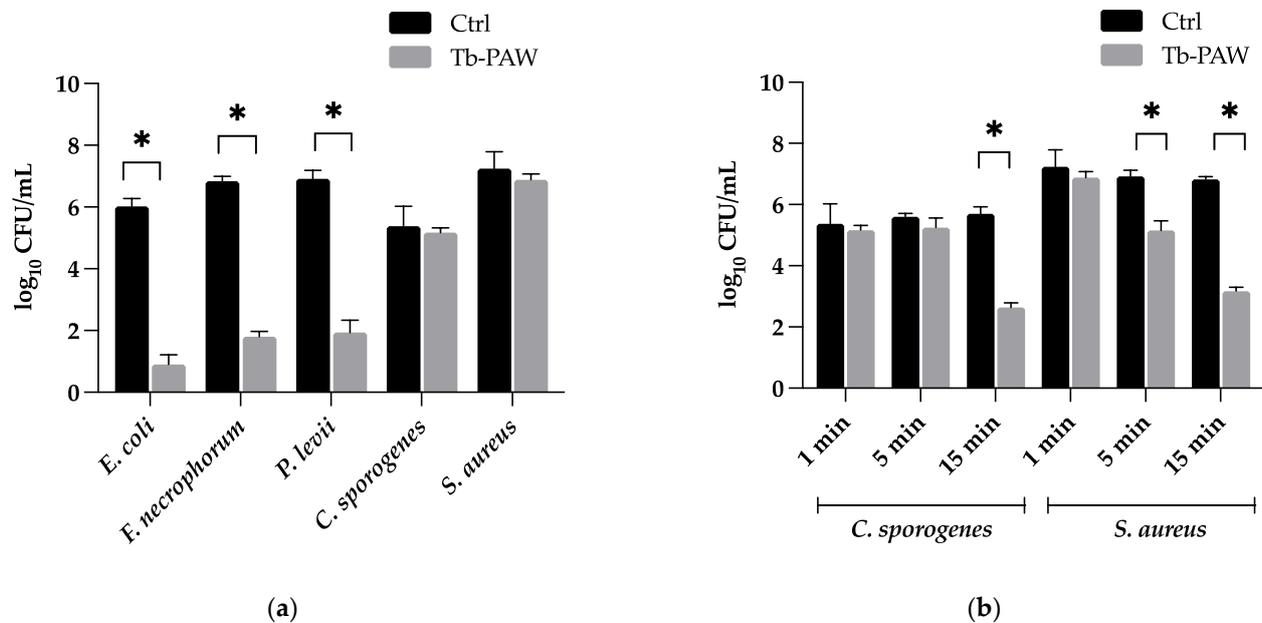
All experiments were repeated at least three times and the results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed with SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey's range test (HSD). All data were visualized with GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Probabilities of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Bactericidal Efficacy of Tb-PAW on Different Microorganisms

The antibacterial effect of Tb-PAW compared to the untreated TRIS-buffer control for the respective pathogens is shown in Figure 3. The Tb-PAW was able to achieve significant reductions of the CFU of Gram-negative bacteria species *E. coli* ( $5.12 \pm 0.46$  log), *F. necrophorum* ( $5.04 \pm 0.03$  log) and *P. levii* ( $4.98 \pm 0.61$  log) after a 1 min exposure time (Figure 3a). Whereas the CFU of *E. coli*, *F. necrophorum* and *P. levii* were decreased below the detection limit, only low but not significant reduction rates of the bacteria numbers were obtained for Gram-positive bacteria *C. sporogenes* ( $0.20 \pm 0.75$  log) and *S. aureus*

( $0.36 \pm 0.40$  log) within 1 min compared to the control samples. After increasing the Tb-PAW exposure time of *C. sporogenes* and *S. aureus* to 5 min (Figure 3b) *S. aureus* was significantly reduced by about  $1.76 \pm 0.27$  log. *C. sporogenes* showed insignificant decreases of the CFU ( $0.36 \pm 0.40$  log). For both bacterial species, an additional exposure time of 15 min was applied, functioning as highest possible practice-oriented treatment duration. The prolonging contact time did enhance the antimicrobial efficacy, leading to significant reductions of  $3.06 \pm 0.38$  log for *C. sporogenes* and  $3.66 \pm 0.16$  log for *S. aureus* (Figure 3b).



**Figure 3.** (a) Inactivation of *Escherichia* (*E.*) *coli*, *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, *Fusobacterium* (*F.*) *necrophorum*, *Porphyromonas* (*P.*) *levii* and *Clostridium* (*C.*) *sporogenes* after 1 min of Tb-PAW treatment (b) Inactivation of *C. sporogenes* and *S. aureus* after 1 min, 5 min and 15 min of Tb-PAW treatment. Results represent the mean  $\pm$  standard deviation. Significant differences are defined as \*  $p \leq 0.05$ . Ctrl = Control (TRIS-buffer); Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water.

We observed that the Tb-PAW used in this study could reduce both Gram-negative and Gram-positive bacteria up to at least 3.0 log. However, *S. aureus* and *C. sporogenes* were more resistant to the Tb-PAW treatment, which reflected in elevated treatment times compared to *E. coli*, *F. necrophorum* and *P. levii*. A comparison of the present results with previously published studies [28,29] is difficult as antimicrobial effects of different PALs are quite variable. This high variability might be due to the application of different parameters such as voltage, working gases and gas flow rate, the treatment regime (used liquid and plasma treatment time), the content of reactive species, the acidity of the PAL or differences of the bacterial strains [24,30–32]. For example, in the present study the inactivation for *S. aureus* within 15 min was higher compared to the study of Tsoukou et al. [28]. Rothwell et al. [29] presented an increased efficacy for *E. coli* (6 log) within 1 min compared to our results. An effect which might be attributed to a lower initial CFU number in the present study. Some studies showed that the utilized bacterial species (*E. coli*, *S. aureus*) were only inactivated after high exposure times. Furthermore, other authors also reported a higher sensitivity of Gram-negative bacteria against PALs [24,28,33,34]. For example, Zhao et al. [24] observed that *S. aureus*, treated with PAW, needed 5 h to be significantly reduced by 3 log steps, whereas *E. coli* reached this reduction within 30 min. Li et al. [34] compared the reduction of the Gram-negative bacterium *Porphyromonas* (*P.*) *gingivalis* and the Gram-positive bacterium *Actinomyces viscosus* after PAW treatment and described a higher inactivation rate for *P. gingivalis* within a shorter treatment time.

The higher effect on the Gram-negative compared to the Gram-positive bacteria may be due to their differences in the cell wall structure. Gram-positive bacteria show

a reduced susceptibility to reactive species due to their significantly thicker cell wall (20–80 nm vs. 10–15 nm) [33]. Furthermore, we have shown that the treatment of anaerobes with Tb-PAW also leads to different inactivations. Our findings depicting an increased impact of Tb-PAW on anaerobic bacteria is supported by the study of Li et al. [34]. They also found that aerobic bacteria, such as *Streptococcus mutans*, are less sensitive than anaerobic bacteria when exposed to comparable concentrations of different ROS species. A strong interdependency of antibacterial efficacy of the applied Tb-PAW's and bacteria species is apparent.

To date, the exact mode of action of PAW has not been fully elucidated. As described by Laroussi et al. [35] the effect of other ROS and RNS produced in PTW besides  $\text{NO}_3^-$  is not well understood. According to Li et al. [36], plasma-activated chemical solutions (PACS) containing  $\text{H}^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  and especially their conversion to peroxyxynitrite, play a key role in microbial decontamination. Zouh et al. [25], who emphasized the role of peroxyxynitrite in their work, also supported this statement. However, other authors have noted that  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hydroxyl radicals ( $\bullet\text{OH}$ ), and ozone ( $\text{O}_3$ ) for example, play important roles (Zhang et al. [37]). Thus, further research is necessary to understand the mode of action of PAW.

The TRIS-buffer used in the present study caused the pH-value of the Tb-PAW to be neutral, giving the opportunity for their in situ application on open wounds and skin of living animals. Some studies compared the results between PAW and plasma-activated buffer in relation to their acidity and figured a lower pH-value would increase the inactivation rate [16,17,38]. Consequently, we decided on the one hand to buffer the PAL, on the other hand to adjust the control solution to the pH-value of the Tb-PAW, which was also associated with high inactivations.

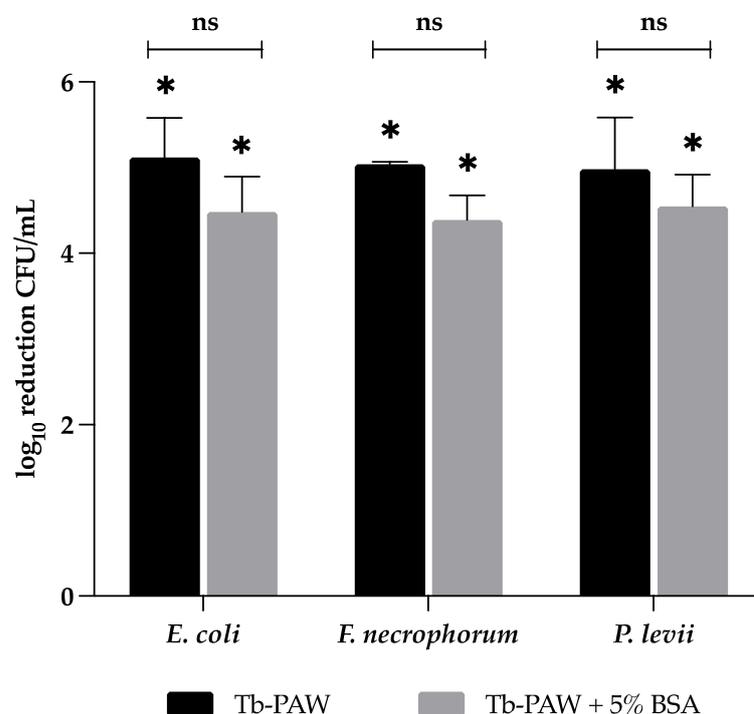
### 3.2. Tb-PAW Inactivation Ability of *E. coli*, *F. necrophorum* and *P. levii* under the Influence of Bovine Serum Albumin

In the present study the impact of bovine serum albumin (BSA) on the antimicrobial capacities of Tb-PAW against *E. coli*, *F. necrophorum* and *P. levii* was tested evaluating if proteins, which are present for example, on the skin of the cattle with DD might influence the overall Tb-PAW efficacy. The reduction rates of Tb-PAW applications containing 5% BSA and without BSA are shown in Figure 4. As described above, the Tb-PAW could significantly ( $p \leq 0.05$ ) reduce all bacterial species below the detection limit. Under the influence of 5% BSA *E. coli* was significantly reduced by  $4.48 \pm 0.42$  log values. The reductions for *F. necrophorum* and *P. levii* using 5% BSA were  $4.39 \pm 0.28$  and  $4.55 \pm 0.37$  log values, respectively. The addition of 5% BSA to the Tb-PAWs revealed no significant impact on occurring reduction rates.

The 30% BSA solution contained  $\text{NaN}_3$  as an antimicrobial agent, thus control samples with the existing concentrations of  $\text{NaN}_3$  (0.1 mg/L) were additionally analyzed during the BSA-impact study. No significant differences between all groups could be obtained. The results are reported in the Supplementary Material (see Table S1).

The presented results disagree with other studies revealing a buffer effect of organic materials, which can considerably reduce antimicrobial activities of PALs [39,40]. BSA is described as a protein that can not only form a physical barrier between microorganisms and reactive species, but also actively interacts with free radicals leading to a decrease in the antimicrobial properties of PALs [39,41]. For example, Zhang et al. [39] demonstrated that BSA reduced the antimicrobial efficacy of PAW against *S. aureus* after a treatment time of 10 min. In the study by Xiang et al. [40], bacterial suspensions were added after combining beef extract or peptone with PAW (different protein concentrations) and after a waiting time of 15 min resulting in decreasing bacterial reduction properties with increasing protein concentrations. In contrast to the previous studies in the present experimental setup the bacteria were exposed to Tb-PAW and BSA at the same time which might explain the different effects between the present and other studies. However, the present setup seems more logical. For example, if a PAL is applied to the skin of living animals, the PAL is likely

to come into contact with the microorganisms as well as with proteins and other (probably disturbing) substances simultaneously.



**Figure 4.** Comparison of the inactivation capacity of Tb-PAW on *E. coli*, *F. necrophorum* and *P. levii* under the influence of BSA. The treatment time for each bacterium was 1 min. Results represent the mean  $\pm$  standard deviation. \* Significant differences between the TRIS-buffer (control) and Tb-PAW samples are defined as  $p \leq 0.05$ . Not significant differences between Tb-PAW and Tb-PAW with 5% BSA are defined as ns. ns = not significant; BSA = bovine serum albumin; Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water.

Other studies indirectly support the present results. If liquids containing bacteria were treated with plasma to obtain a PAL, the proteins and other components in the media had no impact on the bacterial inactivation capacity [42,43]. For example, Rowan et al. [42] inactivated microbial pathogens, such as *E. coli* and *Campylobacter jejuni* in chilled poultry wash water, achieving an increased reduction compared to samples in distilled water. Gurol et al. [43] showed in their study that after treating different types of milk (whole, semi skimmed and skimmed milk) with low pressure plasma, the inactivation of *E. coli* decreased by 54% after 3 min.

In conclusion, the protective effect of proteins against microbial inactivation by PAL seems to depend on several parameters, including the protein source, the amount of protein, the experimental setup (treatment time and treatment procedure), as well as the plasma source and its settings, as evidenced by these various study results.

### 3.3. Tb-PAW Inactivation of *E. coli* after Different Storage Times and Temperatures

In a third study, Tb-PAW was stored at three different temperatures (7 °C, 21 °C and 30 °C) and monitored at four time points (4 h, 8 h, 12 h and 24 h). The bactericidal efficacy of those Tb-PAWs against *E. coli* was tested (Table 1). The comparisons between untreated TRIS-buffer control samples and the corresponding Tb-PAW samples showed significant reductions of the CFU in Tb-PAW at all temperatures and storage times. These ranged from  $5.08 \pm 0.52$  log steps (30 °C, 8 h) to  $0.73 \pm 0.23$  log steps (30 °C, 24 h). The residual microbial content of the Tb-PAW sample at 30 °C and 24 h was significantly higher compared to the 7 °C and 21 °C samples, whereas the other time points revealed no differences between the temperature groups. In addition, we found significantly higher bacterial counts in

the 30 °C treatment group at 24 h compared to the other three time points. We therefore verified that Tb-PAWs stored at 7 °C and 21 °C can be used for a period of 24 h and for at least 12 h when stored at 30 °C.

**Table 1.** Means and standard deviation of *E. coli* counts (log CFU/mL) following 1 min Tb-PAW treatment.

Treatment	Storage (hours)			
	4	8	12	24
7 °C treatment temperature				
Control <sup>1</sup>	4.93 ± 0.81 <sup>A</sup>	5.02 ± 0.74 <sup>A</sup>	5.71 ± 0.59 <sup>A</sup>	5.05 ± 0.63 <sup>A</sup>
Tb-PAW <sup>2</sup>	1.23 ± 0.50 <sup>B</sup>	2.40 ± 0.39 <sup>B</sup>	2.40 ± 0.80 <sup>B</sup>	2.43 ± 0.77 <sup>B,x</sup>
21 °C treatment temperature				
Control	5.31 ± 0.17 <sup>A</sup>	5.56 ± 0.58 <sup>A</sup>	5.71 ± 0.47 <sup>A</sup>	5.27 ± 0.49 <sup>A</sup>
Tb-PAW	1.14 ± 0.42 <sup>B</sup>	1.18 ± 0.83 <sup>B</sup>	2.94 ± 0.57 <sup>B</sup>	2.09 ± 0.88 <sup>B,x</sup>
30 °C treatment temperature				
Control	5.65 ± 0.22 <sup>A</sup>	6.03 ± 0.28 <sup>A</sup>	5.95 ± 0.32 <sup>A</sup>	5.76 ± 0.30 <sup>A</sup>
Tb-PAW	1.16 ± 0.80 <sup>a,B</sup>	0.96 ± 0.45 <sup>a,B</sup>	2.25 ± 0.42 <sup>a,B</sup>	5.03 ± 0.22 <sup>b,B,y</sup>

<sup>a,b</sup> Different small letters within the same row differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). <sup>A,B</sup> Different capital letters within the same column and treatment temperature differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). <sup>x,y</sup> Different letters within the same column differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). <sup>1</sup> TRIS-buffer was used as a control; <sup>2</sup> Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water.

These results are consistent with findings of the study by Shen et al. [44], who also reported prolonged preservation of bactericidal activity when PAW was stored at low temperatures. In this study, the bactericidal properties of a PAW used against *S. aureus* also increased with decreasing temperatures (25 °C < 4 °C < −20 °C < −80 °C). After one day of storage, the reduction rates dropped from 5.0 log CFU/mL (room temperature) to approx. 3.7 log CFU/mL (−80 °C) and 1.8 log CFU/mL (25 °C), respectively. The PAW at −80 °C retained a significantly higher reduction rate and revealed a better way of storage than 25 °C.

Traylor et al. [17] investigated the bactericidal activity of PAW and plasma-activated PBS (PAPBS). They found that storage of PAW resulted in a decreasing reduction effect with time. The PALs were stored for seven days after preparation. Each day, *E. coli* was incubated with the PALs for 15 min as well as for 3 h. Over two days, the 3 h exposure resulted in a 5.0 log reduction before it began to decline, while the 15 min exposure dropped to 2.4 log on the first day (30 min after production) and remained at about 1.0 log until the end of the second day. In contrast to the PAW, the PAPBS did not reach a high reduction at any of the time points and remained below 1.0 log.

The effect of the PALs in these studies appears to decrease with time and at elevated temperature, which is in good agreement with our own findings. However, the decrease varies greatly depending on the study. In the researches described, much longer exposure times (4 min to 3 h) were used compared to our study. In addition, we were able to achieve high reductions rates with Tb-PAW compared to the PAPBS of Traylor et al. [17] using only 1 min exposure time resulting in reduction rates of up to 2.61 logs (7 °C) and 3.18 logs (21 °C) after 24 h.

#### 4. Conclusions

The results of this study demonstrate that Tb-PAW can effectively reduce a range of bacteria involved in the development of DD. The level of reduction is depending on several parameters, including the exposure time and the treated bacterial species. Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *C. sporogenes*) were more resistant to the Tb-PAW than Gram-negative bacteria (*E. coli*, *F. necrophorum* and *P. levii*). As the Tb-PAW in the present study could achieve a fast and high inactivation of the bacterial strains despite a neutral ph-value, the antimicrobial effect of the Tb-PAW seems to be only due to the action of reactive species

within the Tb-PAW. Furthermore, Tb-PAW is maintaining high efficacy levels even under the presence of organic substances. Thus, our results indicate that Tb-PAW might constitute a potential DD-therapy in dairy cows. Due to the high time stability (12 h), even under elevated temperatures with up to 30 °C, Tb-PAW seems to be a promising tool being able to perform under real-life conditions in agricultural holdings, e.g., as a claw bath or spray solution. Further work in progress is focusing on the analysis of Tb-PAW applied directly to skin samples or in situ on wounds infected with DD.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app122312325/s1>, Table S1: Means and standard deviation of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Porphyromonas levii* counts (log<sub>10</sub> CFU/mL) after 1 min treatment of Tb-PAW, Tb-PAW with bovine serum albumin and Tb-PAW with sodium azide.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.P., G.A., L.S., C.K., M.H. (Martina Hoedemaker) and V.G.-P.; methodology, V.G.-P., L.S. and G.A.; software, V.G.-P.; validation, V.G.-P., L.S., M.P. and C.K.; formal analysis, V.G.-P.; investigation, V.G.-P.; resources, C.O., M.H. (Marcus Harms) and R.O.; data curation, V.G.-P.; writing—original draft preparation, V.G.-P.; writing—review and editing, L.S., C.K., G.A., M.P., M.H. (Martina Hoedemaker), C.O., M.H. (Marcus Harms), R.O., B.A., K.A.R., W.V. and L.t.B.; visualization, V.G.-P.; supervision, M.P., L.S., C.K. and G.A.; project administration, L.S.; funding acquisition, B.A., K.A.R., G.A., W.V. and L.t.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the European Innovation Partnership (EIP-AGRI) project “PlaWaKiRi” and funded by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD 276 03 254 021 0329, [http://ec.europa.eu/agriculture/rural-development-2014-2020/index\\_de.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/rural-development-2014-2020/index_de.htm) (accessed on 1 November 2022)), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—491094227 “Open Access Publication Funding” and the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Read, D.H.; Walker, R.L. Papillomatous Digital Dermatitis (Footwarts) in California Dairy Cattle: Clinical and Gross Pathologic Findings. *J. Vet. Diagn. Investig.* **1998**, *10*, 67–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Refaai, W.; Van Aert, M.; Abd El-Aal, A.M.; Behery, A.E.; Opsomer, G. Infectious Diseases Causing Lameness in Cattle with a Main Emphasis on Digital Dermatitis (Mortellaro Disease). *Livest. Sci.* **2013**, *156*, 53–63. [[CrossRef](#)]
3. Melendez, P.; Bartolome, J.; Archbald, L.F.; Donovan, A. The Association between Lameness, Ovarian Cysts and Fertility in Lactating Dairy Cows. *Theriogenology* **2003**, *59*, 927–937. [[CrossRef](#)]
4. Warnick, L.D.; Janssen, D.; Guard, C.L.; Gröhn, Y.T. The Effect of Lameness on Milk Production in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **2001**, *84*, 1988–1997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fiedler, A. Mortellarosche Krankheit—Therapie und Management der digitalen Dermatitis beim Rind. *Veterinär Spieg.* **2022**, *32*, 32–37. [[CrossRef](#)]
6. Moe, K.K.; Yano, T.; Misumi, K.; Kubota, C.; Nibe, K.; Yamazaki, W.; Muguruma, M.; Misawa, N. Detection of Antibodies against *Fusobacterium necrophorum* and *Porphyromonas levii*-like Species in Dairy Cattle with Papillomatous Digital Dermatitis: Antibodies Responses in Cattle with PDD. *Microbiol. Immunol.* **2010**, *54*, 338–346. [[CrossRef](#)]
7. Krull, A.C.; Shearer, J.K.; Gorden, P.J.; Cooper, V.L.; Phillips, G.J.; Plummer, P.J. Deep Sequencing Analysis Reveals Temporal Microbiota Changes Associated with Development of Bovine Digital Dermatitis. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 3359–3373. [[CrossRef](#)]
8. Nielsen, M.W.; Strube, M.L.; Isbrand, A.; Al-Medradi, W.D.H.M.; Boye, M.; Jensen, T.K.; Klitgaard, K. Potential Bacterial Core Species Associated with Digital Dermatitis in Cattle Herds Identified by Molecular Profiling of Interdigital Skin Samples. *Vet. Microbiol.* **2016**, *186*, 139–149. [[CrossRef](#)]
9. Nordhoff, M.; Moter, A.; Schrank, K.; Wieler, L.H. High Prevalence of Treponemes in Bovine Digital Dermatitis—A Molecular Epidemiology. *Vet. Microbiol.* **2008**, *131*, 293–300. [[CrossRef](#)]
10. Wilson-Welder, J.; Alt, D.; Nally, J. Digital Dermatitis in Cattle: Current Bacterial and Immunological Findings. *Animals* **2015**, *5*, 1114–1135. [[CrossRef](#)]

11. Berry, S.L.; Read, D.H.; Famula, T.R.; Mongini, A.; Döpfer, D. Long-Term Observations on the Dynamics of Bovine Digital Dermatitis Lesions on a California Dairy after Topical Treatment with Lincomycin HCl. *Vet. J.* **2012**, *193*, 654–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Laven, R.A.; Hunt, H. Evaluation of Copper Sulphate, Formalin and Peracetic Acid in Footbaths for the Treatment of Digital Dermatitis in Cattle. *Vet. Rec.* **2002**, *151*, 144–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Laven, R.A.; Logue, D.N. Treatment Strategies for Digital Dermatitis for the UK. *Vet. J.* **2006**, *171*, 79–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. El-Shafaey, E.-S.; Hamed, M.A.; Elfadl, E.A.; Gomaa, N.A.; Rizk, M.A. Phenytoin: A Promising Non-Antibiotic Drug for the Topical Treatment of Digital Dermatitis in Dairy Cows. *Vet. World* **2021**, *14*, 2907–2912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Teixeira, A.G.V.; Machado, V.S.; Caixeta, L.S.; Pereira, R.V.; Bicalho, R.C. Efficacy of Formalin, Copper Sulfate, and a Commercial Footbath Product in the Control of Digital Dermatitis. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 3628–3634. [[CrossRef](#)]
16. Joshi, I.; Salvi, D.; Schaffner, D.W.; Karwe, M.V. Characterization of Microbial Inactivation Using Plasma-Activated Water and Plasma-Activated Acidified Buffer. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 1472–1480. [[CrossRef](#)]
17. Traylor, M.J.; Pavlovich, M.J.; Karim, S.; Hait, P.; Sakiyama, Y.; Clark, D.S.; Graves, D.B. Long-Term Antibacterial Efficacy of Air Plasma-Activated Water. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2011**, *44*, 472001. [[CrossRef](#)]
18. Gan, L.; Duan, J.; Zhang, S.; Liu, X.; Poorun, D.; Liu, X.; Lu, X.; Duan, X.; Liu, D.; Chen, H. Cold Atmospheric Plasma Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis in Mice by Mediating Antiproliferative Effects. *Free Radic. Res.* **2019**, *53*, 269–280. [[CrossRef](#)]
19. Kamgang-Youbi, G.; Herry, J.-M.; Meylheuc, T.; Brisset, J.-L.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Doubla, A.; Naïtali, M. Microbial Inactivation Using Plasma-Activated Water Obtained by Gliding Electric Discharges. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *48*, 13–18. [[CrossRef](#)]
20. Subramanian, P.S.G.; Jain, A.; Shivapuji, A.M.; Sundaresan, N.R.; Dasappa, S.; Rao, L. Plasma-activated Water from a Dielectric Barrier Discharge Plasma Source for the Selective Treatment of Cancer Cells. *Plasma Process. Polym.* **2020**, *17*, 1900260. [[CrossRef](#)]
21. Xu, D.; Wang, S.; Li, B.; Qi, M.; Feng, R.; Li, Q.; Zhang, H.; Chen, H.; Kong, M.G. Effects of Plasma-Activated Water on Skin Wound Healing in Mice. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1091. [[CrossRef](#)]
22. ten Bosch, L.; Pfohl, K.; Avramidis, G.; Wieneke, S.; Viöl, W.; Karlovsky, P. Plasma-Based Degradation of Mycotoxins Produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria* Species. *Toxins* **2017**, *9*, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Khlyustova, A.; Labay, C.; Machala, Z.; Ginebra, M.-P.; Canal, C. Important Parameters in Plasma Jets for the Production of RONS in Liquids for Plasma Medicine: A Brief Review. *Front. Chem. Sci. Eng.* **2019**, *13*, 238–252. [[CrossRef](#)]
24. Zhao, Y.-M.; Ojha, S.; Burgess, C.M.; Sun, D.-W.; Tiwari, B.K. Inactivation Efficacy and Mechanisms of Plasma Activated Water on Bacteria in Planktonic State. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 1248–1260. [[CrossRef](#)]
25. Zhou, R.; Zhou, R.; Prasad, K.; Fang, Z.; Speight, R.; Bazaka, K.; Ostrikov, K. Cold Atmospheric Plasma Activated Water as a Prospective Disinfectant: The Crucial Role of Peroxynitrite. *Green Chem.* **2018**, *20*, 5276–5284. [[CrossRef](#)]
26. Yusupov, M.; Bogaerts, A.; Huygh, S.; Snoeckx, R.; van Duin, A.C.T.; Neyts, E.C. Plasma-Induced Destruction of Bacterial Cell Wall Components: A Reactive Molecular Dynamics Simulation. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 5993–5998. [[CrossRef](#)]
27. Chen, H.; Bai, F.; Xiu, Z. Oxidative Stress Induced in *Saccharomyces cerevisiae* Exposed to Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air at Atmospheric Pressure. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2010**, *38*, 1885–1891. [[CrossRef](#)]
28. Tsoukou, E.; Delit, M.; Treint, L.; Bourke, P.; Boehm, D. Distinct Chemistries Define the Diverse Biological Effects of Plasma Activated Water Generated with Spark and Glow Plasma Discharges. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1178. [[CrossRef](#)]
29. Rothwell, J.G.; Alam, D.; Carter, D.A.; Soltani, B.; McConchie, R.; Zhou, R.; Cullen, P.J.; Mai-Prochnow, A. The Antimicrobial Efficacy of Plasma-Activated Water against *Listeria* and *E. Coli* Is Modulated by Reactor Design and Water Composition. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 2490–2500. [[CrossRef](#)]
30. Vlad, I.E.; Martin, C.; Toth, A.R.; Papp, J.; Anghel, S.D. Bacterial Inhibition Effect of Plasma Activated Water. *Rom. Rep. Phys.* **2019**, *71*, 602.
31. Xiang, Q.; Fan, L.; Li, Y.; Dong, S.; Li, K.; Bai, Y. A Review on Recent Advances in Plasma-Activated Water for Food Safety: Current Applications and Future Trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 2250–2268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Royintarat, T.; Seesuriyachan, P.; Boonyawan, D.; Choi, E.H.; Wattanuchariya, W. Mechanism and Optimization of Non-Thermal Plasma-Activated Water for Bacterial Inactivation by Underwater Plasma Jet and Delivery of Reactive Species Underwater by Cylindrical DBD Plasma. *Curr. Appl. Phys.* **2019**, *19*, 1006–1014. [[CrossRef](#)]
33. Ursache, M.; Moraru, R.; Hnatiuc, E.; Nastase, V.; Mares, M. Comparative Assessment of the Relation between Energy Consumption and Bacterial Burden Reduction Using Plasma Activated Water. In Proceedings of the 2014 International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment (OPTIM), Bran, Romania, 22–24 May 2014; IEEE: Piscataway, NJ, USA, 2014; pp. 1036–1041.
34. Li, Y.; Pan, J.; Zhang, Q.; Wang, J.; Zhang, J.; Fang, J. In Vitro Studies of the Antimicrobial Effect of Non-Thermal Plasma-Activated Water as a Novel Mouthwash. *European J. Oral Sci.* **2017**, *125*, 463–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Laroussi, M.; Bekeschus, S.; Keidar, M.; Bogaerts, A.; Lu, X.; Hori, M.; Stapelmann, K.; Miller, V.; Reuter, S.; Laux, C.; et al. Low Temperature Plasma for Biology, Hygiene, and Medicine: Perspective and Roadmap. *IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci.* **2022**, *64*, 127–157. [[CrossRef](#)]
36. Li, Y.; Nie, L.; Liu, D.; Kim, S.; Lu, X. Plasma-activated Chemical Solutions and Their Bactericidal Effects. *Plasma Process. Polym.* **2022**, *19*, 2100248. [[CrossRef](#)]

37. Zhang, Q.; Liang, Y.; Feng, H.; Ma, R.; Tian, Y.; Zhang, J.; Fang, J. A Study of Oxidative Stress Induced by Non-Thermal Plasma-Activated Water for Bacterial Damage. *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *102*, 203701. [[CrossRef](#)]
38. Baik, K.Y.; Kim, Y.H.; Ryu, Y.H.; Kwon, H.S.; Park, G.; Uhm, H.S.; Choi, E.H. Feeding-Gas Effects of Plasma Jets on Escherichia Coli in Physiological. *Plasma Process. Polym.* **2013**, *10*, 235–242. [[CrossRef](#)]
39. Zhang, Q.; Ma, R.; Tian, Y.; Su, B.; Wang, K.; Yu, S.; Zhang, J.; Fang, J. Sterilization Efficiency of a Novel Electrochemical Disinfectant against *Staphylococcus aureus*. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 3184–3192. [[CrossRef](#)]
40. Xiang, Q.; Kang, C.; Zhao, D.; Niu, L.; Liu, X.; Bai, Y. Influence of Organic Matters on the Inactivation Efficacy of Plasma-Activated Water against *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*. *Food Control* **2019**, *99*, 28–33. [[CrossRef](#)]
41. Di Simplicio, P.; Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. The Reactivity of the Sh Group of Bovine Serum Albumin with Free Radicals. *Free Radic. Res. Commun.* **1991**, *14*, 253–262. [[CrossRef](#)]
42. Rowan, N.J.; Espie, S.; Harrower, J.; Anderson, J.G.; Marsili, L.; MacGregor, S.J. Pulsed-Plasma Gas-Discharge Inactivation of Microbial Pathogens in Chilled Poultry Wash Water. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 2805–2810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gurol, C.; Ekinci, F.Y.; Aslan, N.; Korachi, M. Low Temperature Plasma for Decontamination of *E. coli* in Milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Shen, J.; Tian, Y.; Li, Y.; Ma, R.; Zhang, Q.; Zhang, J.; Fang, J. Bactericidal Effects against *S. Aureus* and Physicochemical Properties of Plasma Activated Water Stored at Different Temperatures. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Article

# Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms on Poultry Carcasses with Evaluation of Physicochemical and Sensory Parameters

Vanessa Große-Peclum <sup>1</sup>, Lisa Siekmann <sup>1,\*</sup>, Carsten Krischek <sup>1</sup>, Georg Avramidis <sup>2</sup> , Christian Ochs <sup>2</sup>, Wolfgang Viöl <sup>2</sup>  and Madeleine Plötz <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, 30173 Hannover, Germany

<sup>2</sup> Faculty Engineering and Health, University of Applied Sciences and Arts, 37085 Göttingen, Germany

\* Correspondence: lisa.siekmann@tiho-hannover.de; Tel.: +49-511-856-7314

**Abstract:** Foodborne diseases are mainly caused by the contamination of meat or meat products with pathogenic microorganisms. In this study, we first investigated the in vitro application of TRIS-buffered plasma-activated water (Tb-PAW) on *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* and *Escherichia* (*E.*) *coli*, with a reduction of approx.  $4.20 \pm 0.68$  and  $5.12 \pm 0.46 \log_{10}$  CFU/mL. Furthermore, chicken and duck thighs (inoculated with *C. jejuni* or *E. coli*) and breasts (with natural microflora) with skin were sprayed with Tb-PAW. Samples were packed under a modified atmosphere and stored at 4 °C for 0, 7, and 14 days. The Tb-PAW could reduce *C. jejuni* on days 7 and 14 (chicken) and *E. coli* on day 14 (duck) significantly. In chicken, there were no significant differences in sensory, pH-value, color, and antioxidant activity, but %OxyMb levels decreased, whereas %MetMb and %DeoMb increased. In duck, we observed slight differences in pH-value, color, and myoglobin redox forms for the Tb-PAW, which were not perceived by the sensory test persons. With only slight differences in product quality, its application as a spray treatment may be a useful method to reduce *C. jejuni* and *E. coli* on chicken and duck carcasses.

**Keywords:** plasma-activated water; cold plasma; TRIS-buffer; poultry skin and meat; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; food safety; food quality



**Citation:** Große-Peclum, V.; Siekmann, L.; Krischek, C.; Avramidis, G.; Ochs, C.; Viöl, W.; Plötz, M. Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms on Poultry Carcasses with Evaluation of Physicochemical and Sensory Parameters. *Foods* **2023**, *12*, 1113. <https://doi.org/10.3390/foods12051113>

Academic Editors: Silvia Tappi and Romolo Laurita

Received: 6 February 2023

Revised: 2 March 2023

Accepted: 4 March 2023

Published: 6 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Worldwide, pathogenic microorganisms contaminate meat or meat products, posing a serious health risk to humans [1]. The poultry meat produced in the European Union in 2020 consisted, among others, of 82% broiler meat, 14% turkey meat, and 3% duck meat. Accordingly, the largest part of consumption is broiler meat [2]. However, in other countries, especially in the South Asian region such as Korea, the consumption of duck meat and duck meat products has increased sharply, about five times between 1997 and 2012 [3]. *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) is considered to be the most common bacterial cause of humans gastroenteritis (campylobacteriosis) in the world [1]. In Germany, campylobacteriosis is mainly caused by ingestion of the pathogen via raw and insufficiently heated meat, unpasteurized milk (raw milk), or, less frequently, through contaminated drinking water [4]. In isolated cases, *C. jejuni* can also cause life-threatening diseases such as Guillain-Barré syndrome, which involves neuro-muscular paralysis [5]. *C. jejuni*—which occurs in the intestinal tract of poultry—and other foodborne pathogens such as *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria monocytogenes*, or *Salmonella* spp. can be transferred to carcasses during the slaughtering process [6,7]. In chicken slaughtering, defeathering and evisceration are the most critical process steps for contaminating the meat with *C. jejuni* or *E. coli* [8].

Many scientists have already tried various decontamination strategies to reduce the bacterial load of carcasses and achieve a simultaneous improvement in food shelf life, such

as using chemicals (ethyl-N $\alpha$ -lauroyl-L-arginate hypochloride, peracetic acid, or chlorine-based products), UV-C radiation, or different temperature regimes [9–12]. Unfortunately, these applications often cause negative effects on the products, such as damage to texture, alteration of taste, or formation of carcinogens [13]. Only the use of potable water to remove surface contamination on poultry meat is currently permitted due to European Regulation (EC) No. 853/2004 (Article 3(2)) [14].

In recent years, the use of cold atmospheric plasma (CAP) to reduce a variety of microorganisms on meat and meat products has become increasingly important [15]. However, Rahman et al. [13] described that the design of the plasma devices (mainly atmospheric pressure plasma jet or dielectric barrier discharge) results in decontamination of only a part and not the whole food surface, especially for larger products. In addition, they found that the microorganisms are not affected by the plasma in some cases due to the shielding effect of the surface structure and texture of skin or meat.

Plasma-activated liquids (PAL) have the potential to decontaminate the surface of food [16,17] and contribute to the minimization of pathogens and prevention of human foodborne illnesses [18]. PALs can be made from a variety of liquids, including pure distilled water (plasma-activated water; PAW), phosphate-buffered saline, citrate-phosphate buffers, or acetic acid [19–21]. They contain various highly reactive oxygen and nitrogen species (RONS), such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>), peroxyxynitrite (ONOO<sup>•</sup>), or nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), which are expected to be the key species responsible for the antimicrobial activity [22,23].

Some PALs have already been evaluated for their ability to decontaminate food (vegetables, fruits or meat), with promising results [16,24]. For example, Xiang et al. [24] showed that a 30 min PAW treatment of mung beans could reduce total aerobic bacteria by approx. 2.32 CFU/g. Ma et al. [16] were the first to treat strawberries with PAW and achieved a reduction of approx. 3.4 log<sub>10</sub> CFU/mL. However, with regard to the application of PAW for decontamination on poultry skin or meat, only a few studies have been conducted so far [17,25]. Kang et al. [25] showed that PAW could effectively reduce *Pseudomonas deceptionensis* CM2 on chicken meat by approx. 1.05 log<sub>10</sub> CFU/g, but was associated with significant impairment of chicken breast appearance, odor, texture, and acceptability compared with untreated samples. The reductive properties as well as the influences on meat quality by PALs may vary. This may be due to the fact that different production parameters such as voltage, working gases and gas flow rate, liquid used, or plasma treatment time are applied [17,26–28].

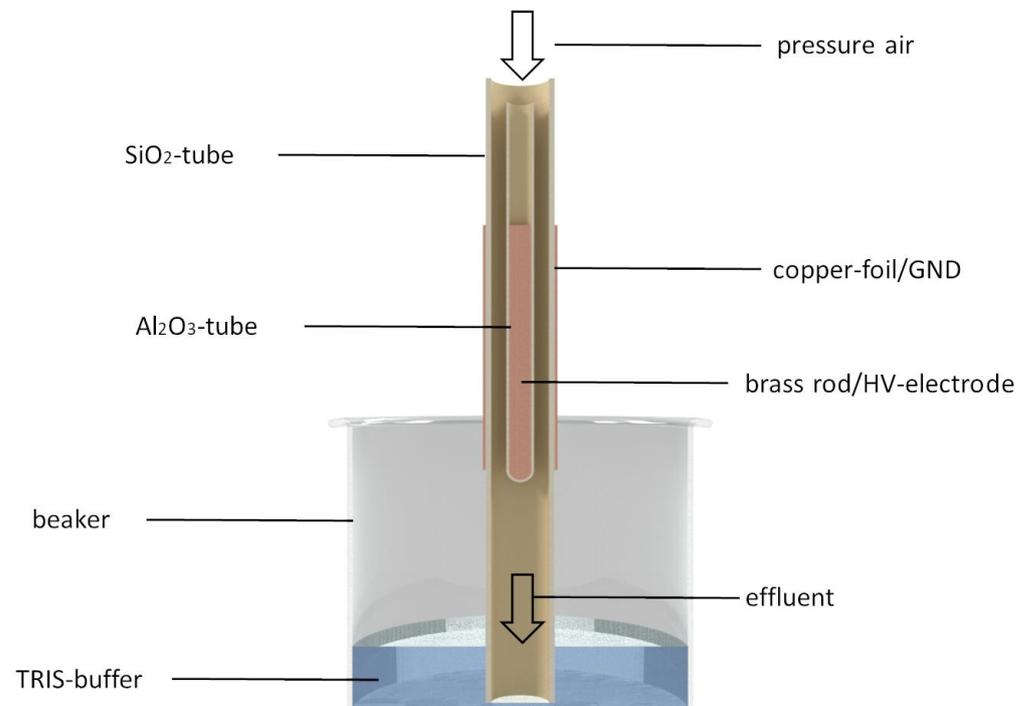
In this study, we investigated the effect of a TRIS-buffered PAW (Tb-PAW) on *C. jejuni*, *E. coli* and total viable count (TVC) of chicken and duck skin (natural matrix) immediately and after 7 and 14 days of storage, respectively. Following microbiological testing, physico-chemical parameters such as antioxidant activity, myoglobin redox forms, and pH-values of meat and skin, as well as sensory parameters were analyzed. These studies will provide information whether Tb-PAW has the potential to reduce contamination on carcasses in meat processing. This should prevent the transmission of pathogens to humans. In addition, this study will investigate the effects of Tb-PAW on the shelf life of meat products and visible sensory characteristics of the meat and skin.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Production of Tb-PAW

For this study 300 mL of a fresh TRIS-buffer (0.5 mol/L), made out of TRIS (TRIS(hydroxymethyl)aminomethan, Trometamol,  $\geq 99.8\%$ , VWR International, Darmstadt, Germany) and TRIS HCl (TRIS(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid,  $\geq 99.0\%$ , VWR) were used. Tb-PAW was prepared using 20 min activation by plasma at the Faculty of Engineering and Health (HAWK, University of Applied Science and Arts, Göttingen, Germany) using a PAL-reactor based on the principle of a double-insulated dielectric barrier discharge. The setup for the generation of Tb-PAW consists of an array of 10 plasma tubes. The single plasma tube consists of an outer silica tube ( $l = 300$  mm, outer diameter

12 mm, wall thickness 1 mm, inner diameter 10 mm), wrapped with copper-foil as ground electrode (GND) and a centrally positioned  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -tube (outer diameter 3 mm, inner diameter 1.6 mm) filled with a brass rod acting as high-voltage electrode (HV-electrode). The discharge gap (length 100 mm) is streamed with pressure air at a gas flow rate of  $5 \text{ L min}^{-1}$ . The outer quartz tube protrudes approx. 5 cm into a beaker filled with the TRIS-buffer (Figure 1).



**Figure 1.** Scheme of a single plasma tube to generate Tb-PAW.

The high voltage power supply provides alternating pulses ( $U = 16.6 \text{ kV}$  peak-peak,  $f = 17 \text{ kHz}$ ,  $t_{\text{pulse}} = 2 \mu\text{s}$ ) with an in-coupled power of approx.  $400 \text{ W}$  to the array. The device used for Tb-PAW production and the corresponding process parameters have already been published by Große-Peclum et al. [29], where a more detailed description of the configuration and operating parameters can be found (see also Supplementary Materials). The experiments started within 4 to 5 h after preparation and transportation to the Institute for Food Quality and Food Safety (LMQS, University of Veterinary Medicine Hannover Foundation, Germany). For the experiments, the pH-values of the TRIS-buffer and Tb-PAW were measured with a pH-meter (Jenway, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, ST15 OSA, UK). Due to the pH decrease of the Tb-PAW ( $7.3 \pm 0.2$ ), the pH of the TRIS-buffer ( $7.6 \pm 0.2$ ) was adjusted in order to exclude a pH effect.

Using a Reflectoquant (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), the Tb-PAW was analyzed with regard to the concentrations of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ; approx.  $5540 \text{ mg/L}$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ; approx.  $440 \text{ mg/L}$ ), as well as hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; approx.  $4.5 \text{ mg/L}$ ) on each experimental day.

## 2.2. Bacterial Strains and Culture Conditions

*E. coli* (DSM 682) and *C. jejuni* (DSM 4688) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany). The microorganisms were plated on Columbia blood agar with sheep blood (Oxoid GmbH, Wesel, Germany). *E. coli* was incubated aerobically at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 24 h, whereas *C. jejuni* was incubated at  $41.5 \text{ }^\circ\text{C}$  under microaerophilic conditions ( $5\% \text{ O}_2$ ,  $10\% \text{ CO}_2$ , and  $85\% \text{ N}_2$ ). A stock culture from each bacterial strain was maintained in a cryotube (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . For the experiment, bacterial colonies were suspended in sterile saline

(0.9% NaCl). Subsequently, *E. coli* was adjusted to a McFarland turbidity standard of 1.5 and *C. jejuni* to 3.0 (approx.  $10^7$ – $10^8$  CFU/mL).

### 2.3. Tb-PAW Treatment of *E. coli* and *C. jejuni*

The microbiological tests were performed in accordance with ISO-10272-1 and ISO-16649-2. 9 mL of Tb-PAW and 9 mL of TRIS-buffer (control) were added to sterile test tubes. Then 1 mL of each bacterial suspension (approx.  $10^7$ – $10^8$  CFU/mL) was added to the Tb-PAW or TRIS-buffer, vortexed, and incubated for 1 min at room temperature. This was followed by serial dilutions, and 100  $\mu$ L of the appropriate dilution stage was spread in duplicate to Colic Brilliance™ *E. coli*/coliform selective agar (ColiC agar, Oxoid, for *E. coli*) or CCDA selective agar (CCDA, Oxoid, for *C. jejuni*). Agar plates were incubated as already described (Section 2.2).

### 2.4. Sample Preparation

For the experiments, 18 fresh chicken carcasses each were obtained from a poultry slaughterhouse and 18 fresh duck carcasses each from a local market in three independent replicates. The carcasses were immediately transported to the LMQS under cooled conditions and stored at 4 °C for one day. The experimental procedure for the chicken and duck carcasses was comparable. Each carcass was dissected to obtain two breasts and two thighs with skin. The breasts and thighs were first weighed (chicken breasts  $379 \pm 24$  g and chicken thighs  $318 \pm 21$  g; duck breasts  $376 \pm 12$  g and duck thighs  $345 \pm 90$  g) and then placed in trays (polypropylene; ES Plastic GmbH & Co. KG, Passau, Germany). Half of the skin of each breast was removed to study the TVC and the presence of *E. coli* and *C. jejuni*, as well as to analyze the effects of Tb-PAW and TRIS-buffer on meat quality directly (skin was previously removed) and indirectly (meat under the skin). Subsequently, 18 thighs were inoculated with 100  $\mu$ L (approx.  $10^4$ – $10^5$  CFU/mL) of the *E. coli* suspension, whereas *C. jejuni* was distributed on the other 18 thighs. After inoculation, the samples were stored at 4 °C for 30 min to allow bacterial attachment before Tb-PAW treatment. Breast skins were not inoculated and were used to evaluate the effect of the Tb-PAW treatment on TVC.

### 2.5. Tb-PAW Treatment and Storage Conditions

For spraying, both Tb-PAW and TRIS-buffer were filled into a universal sprayer from retail. The surface of the breasts and thighs were sprayed with 3 mL  $\pm$  0.5 Tb-PAW or TRIS-buffer (control) from a distance of 15 cm, resulting in a surface density of approx. 11  $\mu$ L/cm<sup>2</sup>. Untreated breasts and thighs were used as additional controls. After spraying, the trays were filled with 70% N<sub>2</sub> and 30% CO<sub>2</sub> and sealed with a transparent film in a semi-automatic packaging machine (Multivac T100, Sepp Haggenmueller GmbH & Co. KG, Wolfertschwerden, Germany). After packaging, the samples were stored at 4 °C for 0, 7, and 14 days. The samples from day 0 were analyzed on the day of packaging, the others on days 7 and 14.

### 2.6. Sensory Evaluation

Three test persons using a 5-point scale evaluated the sensory characteristics of the appearance and odor of the products immediately after opening. The scores were 5 for very good—no deviation from quality expectations, 4 for good—minor deviations, 3 for satisfactory—moderate deviations, 2 for less satisfactory—significant deviations, and 1 for unsatisfactory—major deviations. For the result, following the DLG 5-point test scheme® the points for appearance were multiplied by 3, added with the points for smell and the sum divided by 4 [30].

### 2.7. Microbiological Analysis

Microbiological examinations were performed according to ISO 4833-1:2013. A 5 g skin sample was collected from the breasts and thighs of each treatment group (Tb-PAW, TRIS-buffer, untreated), placed in a sterile bag, filled up to 50 g with peptone-buffered

saline (0.85% NaCl, 0.1% peptone) (VWR), and then homogenized in a Stomacher R© 400 Circulator (Seward Ltd., Worthing, United Kingdom) for 2 min at 230 rpm. Serial dilutions were performed by adding 1 mL of the sample solution to 9 mL of peptone-buffered saline. Subsequently, 100 µL of the diluted suspension was plated on ColiC agar for detection of *E. coli* and on CCDA for detection of *C. jejuni*. For TVC, 1 mL of the suspension was pipetted into a petri dish and filled with warm plate count agar (Oxoid). After incubation (*E. coli* 24 h at 37 °C; *C. jejuni* 48 h at 41.5 °C; TVC 72 h at 30 °C), the number of colonies per plate were counted. The results are expressed as log<sub>10</sub> CFU/g skin.

### 2.8. Color Measurement

After opening the packages containing the breast samples, the surface color of the skin, the skinless meat (directly, skin was previously removed, described in Section 2.4), as well as the meat under the skin (indirectly) were measured using a Chromameter (Minolta CR-400, Konica-Minolta GmbH, Langenhagen, Germany). Using the CIE L\*a\*b\* system, five measurements per sample were taken, and the average of these repeats was used for further statistical analysis. L\* stands for lightness/darkness, a\* for redness/greenness, and b\* for yellowness/blueness.

### 2.9. pH-Value Measurement

After color measurement, the pH-values of the chicken breasts (treatment groups: Tb-PAW, TRIS-buffer, untreated) were measured. A portable pH-meter equipped with a glass electrode (InLab 427 R©, Mettler-Toledo, Urdorf, Switzerland) and a thermometer (Knick Portamess, Knick GmbH, Berlin, Germany) was used for this purpose. Both the glass electrode and the thermometer were inserted into the muscle for measurement.

### 2.10. Analysis of Antioxidant Activity

For the analysis of antioxidant activity, a 1 cm layer was carefully removed from the breast muscle surface below the treated skin, cut into small pieces and stored at −80 °C until analysis (treatment groups: Tb-PAW, TRIS-buffer, untreated). According to Re et al. [31], a 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS<sup>•+</sup>) radical solution was prepared by reacting a 7 mM ABTS solution (ABTS dissolved in distilled water) with potassium persulfate. The radical solution was incubated in the dark for 12 to 16 h at room temperature. Prior to analysis, the ABTS<sup>•+</sup> radical cation was adjusted with distilled water to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. Then 1 g of a breast meat sample was homogenized on ice with 6 mL of distilled water (1 min at 30,000 rpm) and shaken for 1 h at 4 °C in the dark. After centrifugation of the homogenate (2340 × g; 15 min; 4 °C) 20 µL of the supernatant was added to 3 mL of ABTS<sup>•+</sup> radical solution. The same amount of distilled water was used as a control. After 7 min of incubation, the absorbance was measured spectrophotometrically (Evolution 201-UV-VIS spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 734 nm. For calculation of the antioxidant activity, a linear standard curve with 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and R<sup>2</sup> > 0.99 was considered. For creation of the curve, 20 µL of 5 standard solutions containing 2.5, 5.0, 7.5, 10, and 15 µM Trolox were added to 3 mL of ABTS<sup>•+</sup> radical solution and analyzed as described above.

### 2.11. Analysis of Myoglobin Redox form Percentages

For the analysis of the myoglobin redox forms deoxymyoglobin (DeoMb), oxymyoglobin (OxyMb), and metmyoglobin (MetMb), a 1 cm layer was carefully removed from the breast muscle surface below the treated skin, cut into small pieces, frozen in liquid nitrogen, and stored at −80 °C until analysis (treatment groups: Tb-PAW, TRIS-buffer, untreated). Following the description of Bertram et al. [9], 3 g of the frozen meat and 7 mL of phosphate-buffered saline (PBS; Carl Roth) were homogenized (1 min at 30,000 rpm) with a homogenizer (MICCRA D-9, MICCRA GmbH, Heitersheim, Germany). The samples were then centrifuged (35,000 × g; 30 min; 4 °C) and the supernatant was

measured with a spectrophotometer (Evolution 201-UV-VIS-Spectrophotometer, Thermo Scientific) at 503, 525, 557, and 582 nm. DeoMb, OxyMb, and MetMb levels were calculated using the equations of Tang et al. [32].

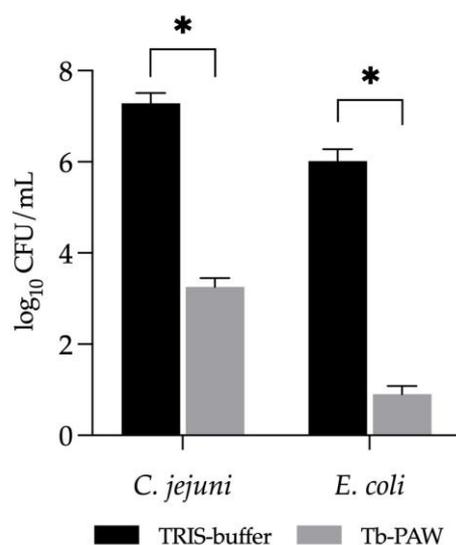
### 2.12. Statistical Analysis of Data

Results from the three independent repeats were used for statistical analysis with SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). At first, the Shapiro-Wilks test for normality and Levene's test for homogeneity of variances were applied. If the data were normally distributed and variance homogenous one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's range test (HSD) were applied. Otherwise, the Wilcoxon-two-sample test was used. The fixed factor of the analysis was the treatment group (Tb-PAW, TRIS-buffer, untreated). The data were visualized with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).  $p$ -values  $\leq 0.05$  were considered significant.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Bactericidal Efficacy of Tb-PAW on *C. jejuni* and *E. coli*

At the outset of the experiments, the efficacy of Tb-PAW in inactivating *C. jejuni* and *E. coli* was assessed. The results are shown in Figure 2. Compared to the untreated TRIS-buffer control, Tb-PAW reduced the pathogens significantly ( $p \leq 0.05$ ) by approx.  $4.20 \pm 0.68 \log_{10}$  CFU/mL (*C. jejuni*) and  $5.12 \pm 0.46 \log_{10}$  CFU/mL (*E. coli*) after a 1 min exposure time.

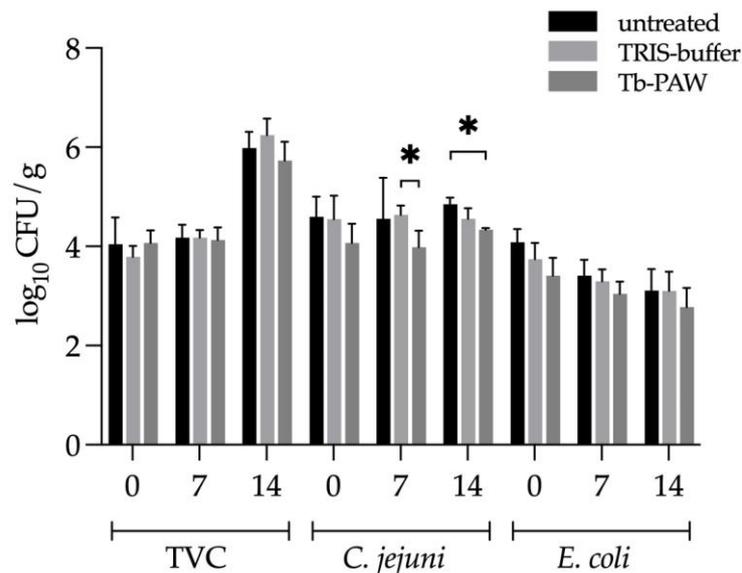


**Figure 2.** Inactivation of *Campylobacter (C.) jejuni* and *Escherichia (E.) coli* after 1 min of Tb-PAW treatment. Results represent the mean  $\pm$  standard deviation. Significant differences are defined as  $* p \leq 0.05$ . Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water.

Due to the application of different parameters such as power and activation time, working gases and flowrate, water source used, as well as different bacterial strains and levels of reactive species, PALs exhibit high variability in their antimicrobial activity [17,26–28]. This makes it more difficult to compare the present results with those of other studies. Both pathogens investigated were reduced by more than  $4.0 \log_{10}$  CFU/mL in a time that was short compared to other published trials [33,34]. For example, Zhao et al. [34] achieved a reduction of  $3.0 \log_{10}$  CFU/mL in *E. coli* after 30 min of treatment with PAW. Xiang et al. [33] treated *E. coli* O157:H7 for 6 min with PAW and only achieved a  $3.70 \log_{10}$  reduction. However, as far as we know, an inactivation of *C. jejuni* (in vitro) by PALs in general has not been published yet. Therefore, these are the first data that show a reduction of *C. jejuni* within a 1 min Tb-PAW treatment.

### 3.2. Microbial Analysis

Spraying the Tb-PAW on the surface of chicken and duck thigh skin after inoculation with *E. coli* and *C. jejuni* and breast skin (without inoculation) followed by modified atmosphere packaging and storage over 14 days resulted in only a minor inhibitory effect on bacteria growth (Figures 3 and 4). The Tb-PAW was able to achieve significant reductions of *C. jejuni* on the 7th and 14th day of storage after treatment of the chicken thigh skins. At day 7, a reduction was observed compared with the TRIS-buffer, whereas at day 14, the reduction only occurred between Tb-PAW and the untreated group. In contrast, *E. coli* and the TVC did not show improved reductions over the storage time after Tb-PAW treatment (Figure 3).



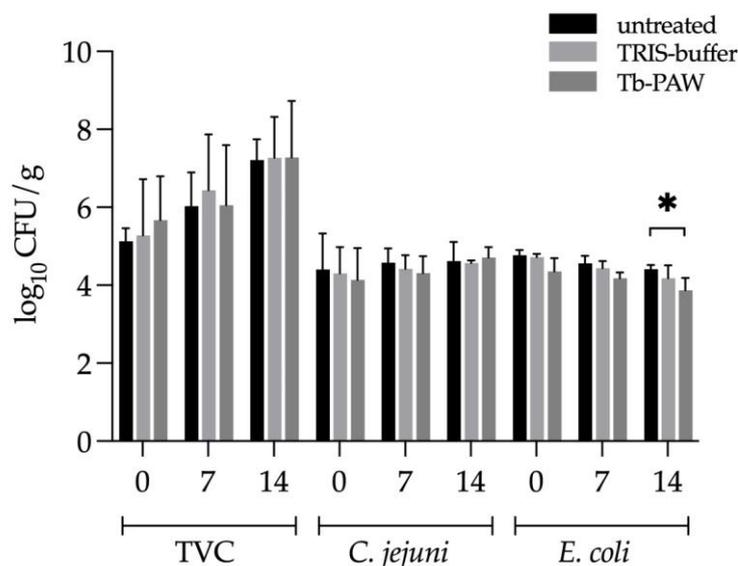
**Figure 3.** Reduction of the total viable count (TVC), *Campylobacter (C.) jejuni* and *Escherichia (E.) coli* on chicken carcasses either with or without Tb-PAW/TRIS-buffer treatment. Untreated and treated breasts (TVC) and thighs (*C. jejuni* and *E. coli*) with skin were stored in modified atmosphere packages (30% CO<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>) at 4 °C for 14 days. The samples from day 0 were analyzed on the packaging day, the others accordingly without re-treatment on days 7 and 14. Results represent the mean ± standard deviation. Significant differences are defined as \*  $p \leq 0.05$ . Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water.

In contrast to chicken skin, the CFU from *E. coli* was significantly reduced by the Tb-PAW compared to the untreated samples on the 14th day of storage of the duck thigh skin. Considering the other storage days or the TVC and *C. jejuni* results, no significant effect of the Tb-PAW treatment could be obtained (Figure 4).

Furthermore, the number of CFU increased noticeably over the days of storage just as with the untreated samples. The chicken samples did not show an increase until 14 days, whereas the CFU increased steadily on the duck samples.

The antimicrobial effect of Tb-PAW on the skin of poultry carcasses yielded a lower reduction of *C. jejuni* and *E. coli* than in our in vitro study (Section 3.1). Currently, there are few studies that have investigated the reduction of microorganisms by PAWs specifically on poultry skin [25,35]. For example Kang et al. [25], who treated chicken breast muscles with PAW found significant antimicrobial effects but after a longer treatment period. The authors reduced *Pseudomonas deceptionensis* CM2 by approx. 1.0 log<sub>10</sub> CFU/g by immersing chicken breasts in PAW for 12 min. However, this decrease was much lower compared the present study and compared to their previously published in vitro study [36] where they achieved a reduction of approx. 5.0 log<sub>10</sub> CFU/mL after 10 min of PAW treatment. Sammanee et al. [35] described a significant reduction in microbial load of *E. coli* and *C. jejuni* after immersion of chicken samples in PAW (containing 60 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 15 min.

However, the reduction by PAW was similar to the water treated control group for *E. coli*, but significant for *C. jejuni*, with reduction levels of  $1.39 \pm 1.10 \log_{10}$  CFU/g.



**Figure 4.** Reduction of the total viable count (TVC), *Campylobacter (C.) jejuni* and *Escherichia (E.) coli* on duck carcasses either with or without Tb-PAW/TRIS-buffer treatment. Untreated and treated breasts (TVC) and thighs (*C. jejuni* and *E. coli*) with skin were stored in modified atmosphere packages (30% CO<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>) at 4 °C for 14 days. The samples from day 0 were analyzed on the packaging day, the others accordingly without re-treatment on days 7 and 14. Results represent the mean  $\pm$  standard deviation. Significant differences are defined as  $* p \leq 0.05$ . Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water.

According to the study by Xiang et al. [37], organic substances like proteins found in chicken breast skins may lead to a reduction in the antibacterial efficacy of PAW. This assumption is supported by the study of Royintarat et al. [17], who evaluated the antibacterial efficacy of PAW against *E. coli* on rough and smooth chicken skin. They found a decrease of only  $0.56 \log_{10}$  on rough skin (thickness of 4 mm) and only  $0.35 \log_{10}$  on smooth skin (thickness of 1 mm) after a 60 min PAW treatment at 40 °C. The organic matrix thus appears to be an important factor influencing the inactivation efficacy of PAL and CAP in general. As described by Fernandez et al. [38], this decreasing effect seems to become stronger when surface convolutions, as they occur on food surfaces or attachment sites, increase and microorganisms attach to their grooves or cavities.

The stability of PAW also plays a role in the inactivation efficiency against pathogens. In the study by Große-Peclum et al. [29], the stability of the Tb-PAW was already tested over a 24 h period. The Tb-PAW was stored at three different temperatures (7 °C, 21 °C, and 30 °C) and examined at four time points (4 h, 8 h, 12 h, and 24 h). This showed a dependence of PAW-stability on storage temperature and duration with an effective time stability of up to 12 h at all temperatures considered.

The spray treatment on the poultry skin and meat occurred on day 0 within this 12 h period. This ensured that time-dependent inactivation effects could be excluded.

In addition, combining Tb-PAW with other technologies such as ultrasound or heat could also increase inactivation efficiency against pathogenic and spoilage microorganisms [17,33].

### 3.3. Sensory Analysis

For chicken, the sensory properties tested were not significantly ( $p > 0.05$ ) different between the treatment groups regardless of the storage day (Table 1). The test persons rated the overall properties on day 0 for both the untreated sample and Tb-PAW or TRIS-buffer

as category 4 (good, slight deviations). On days 7 and day 14, the values after the Tb-PAW treatment remained in category 3 (satisfactory, slight deviations), whereas the values for the untreated sample and for the TRIS-buffer sample were classified in category 2 (less satisfactory, significant deviations). In duck, a significant reduction of the sensory results was observed at day 7 for the TRIS-buffer treated samples compared to the results of the other groups, which had similar sensory results.

**Table 1.** Sensory acceptability (rated by three test persons) and the pH-values of chicken and duck breast meat and skin treated with or without Tb-PAW or TRIS-buffer depending on the day of storage (0, 7, 14) in modified atmosphere packages (30% CO<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>). Results represent the mean  $\pm$  standard deviation. (N = 3).

Group	Storage Days	Treatment	Sensory Analysis	pH-Value
chicken	0	untreated <sup>1</sup>	4.0 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 0.4
		TRIS <sup>2</sup>	4.1 $\pm$ 0.6	5.9 $\pm$ 0.1
		Tb-PAW <sup>3</sup>	4.0 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.1
	7	untreated	2.6 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.1
		TRIS	2.6 $\pm$ 0.4	5.7 $\pm$ 0.2
		Tb-PAW	3.2 $\pm$ 0.6	5.8 $\pm$ 0.1
	14	untreated	2.1 $\pm$ 0.2	5.7 $\pm$ 0.1
		TRIS	2.5 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.1
		Tb-PAW	3.1 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 0.1
duck	0	untreated	4.5 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.1
		TRIS	4.4 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.1
		Tb-PAW	3.9 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.1
	7	untreated	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	5.63 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
		TRIS	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	5.67 $\pm$ 0.1 <sup>a,b</sup>
		Tb-PAW	3.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	5.67 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	14	untreated	2.5 $\pm$ 0.6	5.65 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
		TRIS	2.4 $\pm$ 0.3	5.70 $\pm$ 0.1 <sup>a,b</sup>
		Tb-PAW	3.0 $\pm$ 0.3	5.72 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Different letters within the same column and the same storage day differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). <sup>1</sup> Untreated breast fillets served as controls; <sup>2</sup> TRIS = TRIS-buffer; <sup>3</sup> Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water.

Our results show that Tb-PAW does not negatively affect sensory parameters over a storage period of 14 days in chicken and duck samples compared to the other two treatment groups. The negative effect of the TRIS-buffer on day 7 of the duck experiments should not be overestimated, as it was only found on this storage day. Other authors who treated for example, chicken skin or muscle with PAW also found unchanged sensory characteristics [17] or deterioration [25]. According to Rahman et al. [13], the reactive oxygen and nitrogen species (RONS) contained in PAW can influence the biochemical and sensory properties of a food either positively or negatively. With the current settings of our Tb-PAW, there is no evidence of a negative impact on the sensory properties of the products after spraying.

### 3.4. Analysis of Meat Quality Parameters

Meat quality parameters were analyzed in both chicken and duck due to differences in their natural meat texture and skin structure. While the water, protein, and ash content of the muscles of both species are in comparable ranges (approx. 72–76%, 20–24%, and 1.0–1.3%, respectively), significant differences are found in the fat content. Intramuscularly about 1.3–1.6% fat content was determined in chicken, whereas as much as 2.5% fat was determined in duck. The collagen content was found to be somewhat lower in the duck (1.4%) than in the chicken (1.6–1.8%) [39–43]. However, not only the intramuscular composition, but also the different proportion of subcutaneous adipose tissue is likely to be

relevant for the efficacy of PAW. In ducks, the proportion is significantly higher and can approach 30%, depending on sex and breed. In chickens, subcutaneous fat accounts for only 14% of the carcass [44,45]. Since the Tb-PAW is sprayed onto the skin, there could consequently be significant differences on the muscle under the skin (indirect effect) or on the exposed muscle (direct effect).

In the present study, the pH-value of chicken and duck breast meat was determined, as well as color measurements of the skin and muscle indirectly and directly after Tb-PAW/TRIS-buffer treatment. The color and pH-value are valuable criteria for determining the meat quality. In addition, color is an important indicator for consumers to visually judge the quality of fresh meat [13].

As shown in Tables 1 and 2, there were no significant differences in pH-value and color results for the chicken carcasses on any of the storage days. Slightly, but significantly higher pH-values of the Tb-PAW treated samples were found in the duck carcasses compared to the untreated samples on day 7 and day 14. In addition, at day 0, significant differences of the lightness (L\*) values were found between the Tb-PAW treated and the untreated duck breast skin samples. On day 0, the Tb-PAW treatment also resulted in lower a\* values of the duck skin and meat (treated directly) compared to the other two treatment groups. On day 14, the yellowness/blueness (b\*) values of the Tb-PAW indirectly treated meat were significantly higher compared to the untreated samples.

**Table 2.** Surface color of chicken and duck breast meat and skin treated with or without Tb-PAW or TRIS-buffer depending on the day of storage (0, 7, 14) in modified atmosphere packages (30% CO<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>). Results represent the mean ± standard deviation. (N = 3).

Group	Storage Days	Treatment	Skin Color			Meat Color Direct <sup>4</sup>			Meat Color Indirect <sup>5</sup>		
			L* <sup>6</sup>	a* <sup>7</sup>	b* <sup>8</sup>	L*	a*	b*	L*	a*	b*
chicken	0	untreated <sup>1</sup>	74.3 ± 0.3	4.1 ± 1.7	7.9 ± 1.2	60.1 ± 0.1	0.5 ± 0.5	4.0 ± 0.7	61.0 ± 0.9	1.6 ± 1.1	4.1 ± 0.9
		TRIS <sup>2</sup>	74.2 ± 2.4	3.1 ± 1.4	7.6 ± 2.7	58.3 ± 2.2	-0.1 ± 0.4	2.8 ± 0.7	60.5 ± 1.0	0.5 ± 0.4	4.0 ± 0.5
		Tb-PAW <sup>3</sup>	75.3 ± 0.9	1.7 ± 1.5	7.7 ± 1.6	59.4 ± 1.8	-0.1 ± 0.7	3.0 ± 1.8	60.9 ± 1.8	0.9 ± 0.9	4.0 ± 0.4
	7	untreated	73.6 ± 0.8	2.4 ± 0.9	6.0 ± 1.7	58.6 ± 1.6	1.0 ± 0.9	3.7 ± 1.5	59.1 ± 1.6	2.5 ± 1.3	4.0 ± 1.9
		TRIS	75.9 ± 1.2	2.8 ± 1.2	7.2 ± 1.2	58.8 ± 2.8	1.4 ± 0.1	2.8 ± 2.0	60.7 ± 2.1	2.7 ± 0.6	4.4 ± 1.8
		Tb-PAW	75.6 ± 1.8	2.6 ± 0.6	7.1 ± 1.5	58.2 ± 3.0	1.6 ± 0.3	3.1 ± 2.4	59.0 ± 1.7	4.1 ± 0.6	5.1 ± 1.3
	14	untreated	73.2 ± 2.4	2.1 ± 1.0	6.0 ± 0.9	58.4 ± 5.2	1.6 ± 1.6	3.2 ± 1.7	58.9 ± 3.6	3.8 ± 2.2	4.0 ± 1.0
		TRIS	74.9 ± 0.8	2.0 ± 1.1	7.0 ± 0.5	58.3 ± 2.5	0.6 ± 0.2	2.3 ± 1.1	59.5 ± 0.9	2.2 ± 0.4	4.4 ± 0.8
		Tb-PAW	74.8 ± 1.7	2.0 ± 1.0	6.9 ± 2.1	57.7 ± 2.2	1.2 ± 0.1	2.6 ± 1.1	58.2 ± 0.8	3.4 ± 0.6	4.6 ± 0.6
duck	0	untreated	76.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	4.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	16.4 ± 2.5	47.7 ± 1.4	11.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	6.4 ± 1.3	46.9 ± 1.5	11.8 ± 1.6	5.3 ± 2.6
		TRIS	76.7 ± 0.8 <sup>a,b</sup>	3.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	14.6 ± 2.0	48.3 ± 1.3	10.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	6.5 ± 0.4	46.0 ± 1.2	11.3 ± 0.7	5.4 ± 0.6
		Tb-PAW	78.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	15.0 ± 1.4	47.3 ± 3.0	7.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	6.7 ± 0.3	47.7 ± 1.7	9.4 ± 1.5	5.2 ± 1.9
	7	untreated	77.1 ± 1.0	4.0 ± 1.0	14.1 ± 2.7	49.8 ± 2.8	13.0 ± 1.4	3.8 ± 1.9	48.8 ± 2.2	14.3 ± 1.3	3.1 ± 0.5
		TRIS	78.1 ± 1.2	3.3 ± 0.2	13.0 ± 1.7	48.3 ± 0.3	13.3 ± 1.5	4.3 ± 2.2	49.0 ± 1.8	14.0 ± 1.7	3.6 ± 1.5
		Tb-PAW	78.0 ± 0.4	3.4 ± 0.3	13.4 ± 2.2	48.0 ± 1.1	12.8 ± 0.8	4.6 ± 0.3	47.7 ± 1.9	15.5 ± 2.7	4.8 ± 1.1
	14	untreated	77.9 ± 4.1	5.7 ± 1.5	16.5 ± 2.8	48.5 ± 3.9	14.4 ± 0.9	4.1 ± 0.6	48.2 ± 5.2	15.8 ± 0.9	2.9 ± 0.9 <sup>b</sup>
		TRIS	79.6 ± 5.8	5.5 ± 0.9	14.4 ± 2.6	52.0 ± 3.4	14.6 ± 0.8	5.0 ± 1.0	49.4 ± 2.4	15.5 ± 1.4	4.1 ± 1.9 <sup>a,b</sup>
		Tb-PAW	79.1 ± 6.8	6.2 ± 1.2	14.7 ± 3.0	50.6 ± 3.2	14.3 ± 0.8	4.9 ± 0.8	48.4 ± 5.0	18.5 ± 2.2	5.8 ± 0.5 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Different letters within the same column and the same storage day differ significantly (*p* ≤ 0.05). <sup>1</sup> Untreated breast fillets served as controls; <sup>2</sup> TRIS = TRIS-buffer; <sup>3</sup> Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water. <sup>4</sup> direct = color values determined after application of Tb-PAW/TRIS-buffer directly to the meat surface; <sup>5</sup> indirect = color values determined after application of Tb-PAW/TRIS-buffer to the skin before analysis on the meat below the treated skin; <sup>6</sup> L\* = lightness; <sup>7</sup> a\* = red-green index; <sup>8</sup> b\* = yellow-blue index.

Considering the pH-values, the presented results are expected, as we tried to minimize any pH effect on the results in the present study by adjusting the Tb-PAW and the TRIS-solutions before treatment. Sammanee et al. [35] also evaluated the pH-value of chicken meat during a storage period of 10 days and found similar results between the PAW and untreated samples. In the study by Kang et al. [25], who treated chicken breasts without skin between 0 and 12 min with different PAWs, the initial pH-value for the control samples was 5.77. They described only a slight but significant decrease of the pH-value to approximately 5.70 after 12 min of treatment. This result might be attributed to the direct PAW treatment of chicken meat with an acidic pH-value. In contrast, in the present study, the Tb-PAW had

a neutral pH-value and was sprayed on the skin, which could be a reason for unchanged or slightly increased pH-values.

As for the color, on one hand, many researchers have found no significant color change after PAW treatment of chicken breast [25], chicken meat and skin [17], or beef [46,47]. Qian et al. [48], on the other hand, found a lower  $a^*$  value after PAW treatment, but they considered this change to be small and acceptable to consumers. Supporting this, the results in the present study also showed a decrease in  $a^*$  values at day 0 (skin and muscle direct) in the duck carcasses. As described by Fröhling et al. [49]. The hydrogen peroxide produced in PAWs can react with myoglobin, giving treated meat a reduced red appearance. Furthermore, we found a slight increase in  $L^*$  levels (skin, day 0) and  $b^*$  levels (indirect muscle, day 14) in ducks but not in chicken. Sammanee et al. [35] also found increased  $L^*$  levels on pork skin samples and increased  $b^*$  levels (day 10) in pork red muscle, but no changes in chicken.

Overall, we can conclude that we merely found slight color differences after Tb-PAW treatment in our study, but these were perceived in the sensory evaluation.

### 3.5. Analysis of Myoglobin Redox Form Percentages and Antioxidant Activity

We analyzed the myoglobin redox forms and the antioxidant activity of chicken and duck breast muscles after indirect Tb-PAW and TRIS-buffer treatment (Table 3).

**Table 3.** Percentages of oxymyoglobin (OxyMb), metmyoglobin (MetMb), and deoxymyoglobin (DeoMb) and the antioxidant activities of chicken and duck breast meat, treated on the skin above the meat with or without Tb-PAW or TRIS-buffer, depending on the day of storage (0, 14) in modified atmosphere packages (30% CO<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>). Results represent the mean  $\pm$  standard deviation. (N = 3).

Group	Storage Days	Treatment	%OxyMb	%MetMb	%DeoMb	Antioxidant Activity <sup>4</sup>
chicken	0	untreated <sup>1</sup>	21.9 $\pm$ 2.6	55.6 $\pm$ 2.6	22.5 $\pm$ 0.4	24.2 $\pm$ 8.0
		TRIS <sup>2</sup>	19.6 $\pm$ 1.9	56.9 $\pm$ 1.4	23.5 $\pm$ 1.4	23.1 $\pm$ 9.4
		Tb-PAW <sup>3</sup>	19.1 $\pm$ 1.3	57.7 $\pm$ 0.8	23.2 $\pm$ 0.7	24.0 $\pm$ 11.6
	14	untreated	24.7 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	53.6 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	21.5 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	21.7 $\pm$ 9.3
		TRIS	21.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	56.5 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	21.9 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	23.3 $\pm$ 6.8
		Tb-PAW	14.6 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	60.8 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	24.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	24.0 $\pm$ 7.8
duck	0	untreated	68.9 $\pm$ 6.7	22.6 $\pm$ 5.3	6.4 $\pm$ 1.9	15.4 $\pm$ 1.8
		TRIS	63.5 $\pm$ 4.5	26.7 $\pm$ 2.8	7.9 $\pm$ 1.8	15.5 $\pm$ 1.4
		Tb-PAW	64.4 $\pm$ 3.3	25.7 $\pm$ 2.7	7.9 $\pm$ 1.0	16.0 $\pm$ 1.6
	14	untreated	68.8 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	20.7 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	8.2 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	14.0 $\pm$ 1.0
		TRIS	50.9 $\pm$ 9.6 <sup>b</sup>	32.6 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 4.7 <sup>a,b</sup>	14.3 $\pm$ 2.1
		Tb-PAW	51.5 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>	32.8 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>	13.9 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	14.4 $\pm$ 2.4

<sup>a,b</sup> Different letters within the same column and the same storage day differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). <sup>1</sup> Untreated breast fillets served as controls; <sup>2</sup> TRIS = TRIS-buffer; <sup>3</sup> Tb-PAW = TRIS-buffered plasma-activated water. <sup>4</sup> in  $\mu\text{mol Trolox eq.} \times \text{g}^{-1}$ .

Antioxidants reduce reactive (oxygen, nitrogen) species thereby preventing or delaying cell damage (caused by the free radicals or unstable molecules). Thus, they help maintain the sensory properties of foods such as color, texture, freshness, odor and taste [50]. PAWs contain many radicals, for example, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which could decrease the amount of antioxidants and thus decrease the antioxidant activity of the samples. However, in the present study, the treatment with Tb-PAW had no significant reducing effect on the antioxidant activity of either chicken, or duck samples.

Myoglobin can occur in different states, namely as oxymyoglobin (OxyMb), deoxymyoglobin (DeoMb), or metmyoglobin (MetMb) and mainly influence the meat color. Here, the OxyMb provides the expected red appearance of the meat, due to the oxygenation of the myoglobin after oxygen contact. The DeoMb with its purple color is often found in vacuum stored meat. However, these two forms are so unstable that they can be converted

to MetMb, which discolors the meat and gives it a brownish appearance [51]. In addition, duck meat has a much higher myoglobin content, therefore it appears much redder and chicken meat paler [52,53]. These color differences could result in different outcomes of the Tb-PAW application.

In this study, we analyzed the percentages of OxyMb (%OxyMb), MetMb (%MetMb), and DeoMb (%DeoMb) on the surface of the meat after treatment of the skin above these samples. No significant differences in %OxyMb, %DeoMb, and %MetMb were observed between all treatment groups on day 0 of storage in chicken as well as in duck. However, on day 14, in chicken Tb-PAW caused significantly lower %OxyMb and significantly higher %MetMb and %DeoMb results compared to the TRIS and untreated meat samples who had similar myoglobin redox form results. The effects of Tb-PAW on the myoglobin redox form percentages in duck were mainly similar on day 14, but the significant differences were between the untreated sample and Tb-PAW or TRIS-buffer (%OxyMb, %MetMb). For %DeoMb, only Tb-PAW and the untreated sample were significantly different.

To the best of our knowledge, no other studies have been published that investigated antioxidant activities of chicken or duck meat after PAW treatment. However, the present results are supported by studies that treated mung bean sprouts [24], grape extracts [54], and fresh-cut apples [55] with PAW and also found no effect on the antioxidant activities.

According to Mir et al. [56], the myoglobin content and muscle pH contribute to meat color and color defects. It seems that Tb-PAW (chicken and duck) and TRIS-buffer (only duck) cause a faster oxidation of %OxyMb to %MetMb under the skin than the untreated control. Compared to the lower %OxyMb and increased %MetMb and %DeoMb values, altered  $L^*a^*b^*$  values of the indirectly treated meat sample would have been expected on day 14, but were not observed. Only in duck was a very slight deviation of  $b^*$  values into the yellowish range, but this should not be overestimated. In the study of Astorga et al. [57], a PAW was tested on its storage quality of beef including the evaluation of myoglobin redox forms. They found no significant differences in %OxyMb for all PAW treatments compared to the untreated control.

The results show clear differences in the effect of Tb-PAW as well as TRIS-buffer in chicken and duck. This might be due to the species-specific characteristics of skin and muscle as described above.

#### 4. Conclusions

The results of the present study show that Tb-PAW was able to reduce the amount of *C. jejuni* and *E. coli*. However, the in vitro experiment was associated with much higher reductions than the skin experiments. Nevertheless, promising reductions in bacterial counts of *C. jejuni* and *E. coli* were also observed on the surface of chicken and duck skin during the 14 day storage period after treatment. At the same time, Tb-PAW caused only minor significant changes in the physicochemical properties of chicken and duck skin and meat, which could not even be perceived in sensory analysis. However, the antimicrobial effect of Tb-PAW may vary greatly due to the influence of different parameters such as animal species or skin surfaces. The manufacture of Tb-PAW on a laboratory scale is currently associated with elevated operating and manufacturing costs, including the set-up of the plasma source (single-unit production), electricity for PAW production, and costs for the TRIS buffer. For example, the production of 1 L Tb-PAW under experimental conditions currently requires 0.5 kWh. However, in the case of an industrial application with optimized production processes, these costs could be significantly reduced (series production of the Tb-PAW) and a cost-effective and practical application of the Tb-PAW would be possible. In future studies, increasing the concentration of RONS in Tb-PAW, as well as combining Tb-PAW with other technologies such as ultrasound or heat, could enhance the reducing effect on the skin and thus reduce the risk of foodborne diseases such as campylobacteriosis.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods12051113/s1>, Figure S1: (a) Scheme of the plasma tube array to generate Tb-PAW (b) Scheme of the single plasma tube; Figure S2: U–I-characteristics of the plasma source at a power of approx. 400 W. Detailed information with regard to the plasma device and production of Tb-PAW from Große-Peclum et al. [29].

**Author Contributions:** Conceptualization, M.P., G.A., L.S., C.K. and V.G.-P.; methodology, V.G.-P., L.S. and G.A.; software, V.G.-P.; validation, V.G.-P., L.S., M.P. and C.K.; formal analysis, V.G.-P.; investigation, V.G.-P.; resources, C.O.; data curation, V.G.-P.; writing—original draft preparation, V.G.-P.; writing—review and editing, L.S., C.K., G.A., M.P., C.O. and W.V.; visualization, V.G.-P.; supervision, M.P., L.S., C.K. and G.A.; project administration, G.A., L.S.; funding acquisition, M.P., C.K., L.S., G.A. and W.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the European Innovation Partnership (EIP-AGRI) project “PlaWaKiRi” and funded by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD 276 03 254 021 0329, [http://ec.europa.eu/agriculture/rural-development-2014-2020/index\\_de.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/rural-development-2014-2020/index_de.htm) (accessed on 1 November 2022)), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—491094227 “Open Access Publication Funding” and the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article or Supplementary Material.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. World Health Organization Campylobacter. Available online: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>, (accessed on 3 February 2023).
2. Windhorst, H.-W. Patterns and Dynamics of the EU Poultry Industry: A Status Report—Part 2. Available online: <https://zootechnicainternational.com/focus-on/market-trends/patterns-and-dynamics-of-the-eu-poultry-industry-a-status-report-part-2/> (accessed on 3 February 2023).
3. Kim, H.-J.; Yong, H.I.; Lee, H.J.; Jung, S.; Kwon, J.-H.; Heo, K.N.; Jo, C. Identification of Microorganisms in Duck Meat Products Available in Korea and the Effect of High Hydrostatic Pressure. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2016**, *36*, 283–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. RKI. *Campylobacter-Enteritis*; Robert-Koch-Institute: Berlin, Germany, 2018.
5. Altekruse, S.F.; Stern, N.J.; Fields, P.I.; Swerdlow, D.L. *Campylobacter jejuni*—An Emerging Foodborne Pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**, *5*, 28–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Omer, M.K.; Álvarez-Ordoñez, A.; Prieto, M.; Skjerve, E.; Asehun, T.; Alvseike, O.A. A Systematic Review of Bacterial Foodborne Outbreaks Related to Red Meat and Meat Products. *Foodborne Pathog. Dis.* **2018**, *15*, 598–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Rothrock, M.J.; Zhuang, H.; Lawrence, K.C.; Bowker, B.C.; Gamble, G.R.; Hiatt, K.L. In-Package Inactivation of Pathogenic and Spoilage Bacteria Associated with Poultry Using Dielectric Barrier Discharge-Cold Plasma Treatments. *Curr. Microbiol.* **2017**, *74*, 149–158. [[CrossRef](#)]
8. Pacholewicz, E.; Swart, A.; Schipper, M.; Gortemaker, B.G.M.; Wagenaar, J.A.; Havelaar, A.H.; Lipman, L.J.A. A Comparison of Fluctuations of Campylobacter and *Escherichia coli* Concentrations on Broiler Chicken Carcasses during Processing in Two Slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *205*, 119–127. [[CrossRef](#)]
9. Bertram, R.; Kehrenberg, C.; Seinige, D.; Krischek, C. Peracetic Acid Reduces Campylobacter Spp. Numbers and Total Viable Counts on Broiler Breast Muscle and Drumstick Skins during Modified Atmosphere Package Storage. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 5064–5073. [[CrossRef](#)]
10. Demirok, E.; Veluz, G.; Stuyvenberg, W.V.; Castañeda, M.P.; Byrd, A.; Alvarado, C.Z. Quality and Safety of Broiler Meat in Various Chilling Systems. *Poult. Sci.* **2013**, *92*, 1117–1126. [[CrossRef](#)]
11. Houghton, P.N.; Lyng, J.G.; Cronin, D.A.; Morgan, D.J.; Fanning, S.; Whyte, P. Efficacy of UV Light Treatment for the Microbiological Decontamination of Chicken, Associated Packaging, and Contact Surfaces. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 565–572. [[CrossRef](#)]
12. Bechstein, D.-V.; Popp, J.; Sudhaus-Joern, N.; Krischek, C. Effect of Ethyl-Lauroyl-Arginate Hypochloride in Combination with High Hydrostatic Pressure Processing on the Microbial Load and Physico-Chemical Characteristics of Minced and Portioned Chicken Breast Meat. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 966–976. [[CrossRef](#)]
13. Rahman, M.; Hasan, M.d.S.; Islam, R.; Rana, R.; Sayem, A.; Sad, M.d.A.A.; Matin, A.; Raposo, A.; Zandonadi, R.P.; Han, H.; et al. Plasma-Activated Water for Food Safety and Quality: A Review of Recent Developments. *J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 6630. [[CrossRef](#)]
14. European Commission. *Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council*; European Commission: Brussels, Belgium, 2022.

15. Nasiru, M.M.; Frimpong, E.B.; Muhammad, U.; Qian, J.; Mustapha, A.T.; Yan, W.; Zhuang, H.; Zhang, J. Dielectric Barrier Discharge Cold Atmospheric Plasma: Influence of Processing Parameters on Microbial Inactivation in Meat and Meat Products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 2626–2659. [[CrossRef](#)]
16. Ma, R.; Wang, G.; Tian, Y.; Wang, K.; Zhang, J.; Fang, J. Non-Thermal Plasma-Activated Water Inactivation of Food-Borne Pathogen on Fresh Produce. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *300*, 643–651. [[CrossRef](#)]
17. Royintarat, T.; Seesuriyachan, P.; Boonyawan, D.; Choi, E.H.; Wattanachariya, W. Mechanism and Optimization of Non-Thermal Plasma-Activated Water for Bacterial Inactivation by Underwater Plasma Jet and Delivery of Reactive Species Underwater by Cylindrical DBD Plasma. *Curr. Appl. Phys.* **2019**, *19*, 1006–1014. [[CrossRef](#)]
18. Thirumdas, R.; Kothakota, A.; Annapure, U.; Siliveru, K.; Blundell, R.; Gatt, R.; Valdramidis, V.P. Plasma Activated Water (PAW): Chemistry, Physico-Chemical Properties, Applications in Food and Agriculture. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *77*, 21–31. [[CrossRef](#)]
19. Joshi, I.; Salvi, D.; Schaffner, D.W.; Karwe, M.V. Characterization of Microbial Inactivation Using Plasma-Activated Water and Plasma-Activated Acidified Buffer. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 1472–1480. [[CrossRef](#)]
20. Kang, T.; Yim, D.; Kim, S.-S.; Baek, K.H.; Kim, H.-J.; Jo, C. Effect of Plasma-Activated Acetic Acid on Inactivation of Salmonella Typhimurium and Quality Traits on Chicken Meats. *Poult. Sci.* **2022**, *101*, 101793. [[CrossRef](#)]
21. Traylor, M.J.; Pavlovich, M.J.; Karim, S.; Hait, P.; Sakiyama, Y.; Clark, D.S.; Graves, D.B. Long-Term Antibacterial Efficacy of Air Plasma-Activated Water. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2011**, *44*, 472001. [[CrossRef](#)]
22. Zhou, R.; Zhou, R.; Prasad, K.; Fang, Z.; Speight, R.; Bazaka, K.; Ostrikov, K. (Ken) Cold Atmospheric Plasma Activated Water as a Prospective Disinfectant: The Crucial Role of Peroxynitrite. *Green Chem.* **2018**, *20*, 5276–5284. [[CrossRef](#)]
23. Li, Y.; Nie, L.; Liu, D.; Kim, S.; Lu, X. Plasma-activated Chemical Solutions and Their Bactericidal Effects. *Plasma Process. Polym.* **2022**, *19*, 2100248. [[CrossRef](#)]
24. Xiang, Q.; Liu, X.; Ma, Y.; Xu, C.; Bai, Y. Effect of Plasma-Activated Water on Microbial Quality and Physicochemical Characteristics of Mung Bean Sprouts. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *52*, 49–56. [[CrossRef](#)]
25. Kang, C.; Xiang, Q.; Zhao, D.; Wang, W.; Niu, L.; Bai, Y. Inactivation of *Pseudomonas Deceptionensis* CM2 on Chicken Breasts Using Plasma-Activated Water. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 4938–4945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Herianto, S.; Hou, C.; Lin, C.; Chen, H. Nonthermal Plasma-activated Water: A Comprehensive Review of This New Tool for Enhanced Food Safety and Quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 583–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Xiang, Q.; Fan, L.; Li, Y.; Dong, S.; Li, K.; Bai, Y. A Review on Recent Advances in Plasma-Activated Water for Food Safety: Current Applications and Future Trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 2250–2268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Vlad, I.E.; Martin, C.; Toth, A.R.; Papp, J.; Anghel, S.D. Bacterial Inhibition Effect of Plasma Activated Water. *Rom. Rep. Phys.* **2019**, *71*, 602.
29. Große-Peclum, V.; Siekmann, L.; Krischek, C.; Avramidis, G.; ten Bosch, L.; Harms, M.; Ochs, C.; Ortmann, R.; Hoedemaker, M.; Ahlfeld, B.; et al. An In Vitro Model Using TRIS-Buffered Plasma-Activated Water to Reduce Pathogenic Microorganisms Involved in Digital Dermatitis Infection in Cattle. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12325. [[CrossRef](#)]
30. Hildebrandt, G.; Schneider-Häder, B. *Sensorische Analyse: Methodenüberblick und Einsatzbereiche—DLG-Sensorik; DLG-Expertenwissen*; Frankfurt, Germany, 2009.
31. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
32. Tang, J.; Faustman, C.; Hoagland, T.A. Krzywicki Revisited: Equations for Spectrophotometric Determination of Myoglobin Redox Forms in Aqueous Meat Extracts. *J. Food Sci.* **2006**, *69*, C717–C720. [[CrossRef](#)]
33. Xiang, Q.; Wang, W.; Zhao, D.; Niu, L.; Li, K.; Bai, Y. Synergistic Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by Plasma-Activated Water and Mild Heat. *Food Control* **2019**, *106*, 106741. [[CrossRef](#)]
34. Zhao, Y.-M.; Ojha, S.; Burgess, C.M.; Sun, D.-W.; Tiwari, B.K. Inactivation Efficacy and Mechanisms of Plasma Activated Water on Bacteria in Planktonic State. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 1248–1260. [[CrossRef](#)]
35. Sammanee, P.; Ngamsanga, P.; Jainonthee, C.; Chupia, V.; Sawangrat, C.; Kerdjana, W.; Lampang, K.N.; Meeyam, T.; Pichpol, D. Decontamination of Pathogenic and Spoilage Bacteria on Pork and Chicken Meat by Liquid Plasma Immersion. *Foods* **2022**, *11*, 1743. [[CrossRef](#)]
36. Xiang, Q.; Kang, C.; Niu, L.; Zhao, D.; Li, K.; Bai, Y. Antibacterial Activity and a Membrane Damage Mechanism of Plasma-Activated Water against *Pseudomonas Deceptionensis* CM2. *LWT* **2018**, *96*, 395–401. [[CrossRef](#)]
37. Xiang, Q.; Kang, C.; Zhao, D.; Niu, L.; Liu, X.; Bai, Y. Influence of Organic Matters on the Inactivation Efficacy of Plasma-Activated Water against *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*. *Food Control* **2019**, *99*, 28–33. [[CrossRef](#)]
38. Fernández, A.; Thompson, A. The Inactivation of Salmonella by Cold Atmospheric Plasma Treatment. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 678–684. [[CrossRef](#)]
39. Da Silva, D.C.F.; de Arruda, A.M.V.; Gonçalves, A.A. Quality Characteristics of Broiler Chicken Meat from Free-Range and Industrial Poultry System for the Consumers. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 1818–1826. [[CrossRef](#)]
40. Stęczny, K.; Kokoszynski, D. Effects of Probiotics and Sex on Physicochemical, Sensory and Microstructural Characteristics of Broiler Chicken Meat. *Ital. J. Anim. Sci.* **2019**, *18*, 1385–1393. [[CrossRef](#)]
41. Mazzoni, M.; Petracchi, M.; Meluzzi, A.; Cavani, C.; Clavenzani, P.; Sirri, F. Relationship between Pectoralis Major Muscle Histology and Quality Traits of Chicken Meat. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 123–130. [[CrossRef](#)]

42. Huo, W.; Weng, K.; Gu, T.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Chen, G.; Xu, Q. Effect of Muscle Fiber Characteristics on Meat Quality in Fast- and Slow-Growing Ducks. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 101264. [[CrossRef](#)]
43. Wawro, K.; Wilkiewicz-Wawro, E.; Kleczek, K.; Brzozowski, W. Slaughter Value and Meat Quality of Muscovy Ducks, Pekin Ducks and Their Crossbreeds, and Evaluation of the Heterosis Effect. *Arch. Anim. Breed.* **2004**, *47*, 287–299. [[CrossRef](#)]
44. Ding, S.-R.; Li, G.-S.; Chen, S.-R.; Zhu, F.; Hao, J.-P.; Yang, F.-X.; Hou, Z.-C. Comparison of Carcass and Meat Quality Traits between Lean and Fat Pekin Ducks. *Anim. Biosci.* **2021**, *34*, 1193–1201. [[CrossRef](#)]
45. Bochno, R.; Rymkiewicz, J.; Janiszewska, M. Regression Equations for the Estimation of the Meat and Fat Content in Broiler Carcasses. *J. Anim. Feed Sci.* **1999**, *8*, 73–80. [[CrossRef](#)]
46. Zhao, Y.; Tian, E.; Liu, D.; Niu, J.; Wang, W.; Qi, Z.; Xia, Y.; Song, Y.; Zhao, Z. Plasma-Activated Water Treatment of Fresh Beef: Bacterial Inactivation and Effects on Quality Attributes. *IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci.* **2018**, *4*, 113–120. [[CrossRef](#)]
47. Qian, J.; Zhuang, H.; Nasiru, M.M.; Muhammad, U.; Zhang, J.; Yan, W. Action of Plasma-Activated Lactic Acid on the Inactivation of Inoculated *Salmonella Enteritidis* and Quality of Beef. In *Action of Plasma-activated Lactic Acid on the Inactivation of Inoculated Salmonella Enteritidis and Quality of Beef*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019. [[CrossRef](#)]
48. Qian, J.; Wang, C.; Zhuang, H.; Nasiru, M.M.; Zhang, J.; Yan, W. Evaluation of Meat-Quality and Myofibrillar Protein of Chicken Drumsticks Treated with Plasma-Activated Lactic Acid as a Novel Sanitizer. *LWT* **2021**, *138*, 110642. [[CrossRef](#)]
49. Fröhling, A.; Durek, J.; Schnabel, U.; Ehlbeck, J.; Bolling, J.; Schlüter, O. Indirect Plasma Treatment of Fresh Pork: Decontamination Efficiency and Effects on Quality Attributes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2012**, *16*, 381–390. [[CrossRef](#)]
50. Wilson, D.; Nash, P.; Buttar, H.; Griffiths, K.; Singh, R.; De Meester, F.; Horiuchi, R.; Takahashi, T. The Role of Food Antioxidants, Benefits of Functional Foods, and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person: An Overview. *Antioxidants* **2017**, *6*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Mancini, R.A.; Hunt, M.C. Current Research in Meat Color. *Meat Sci.* **2005**, *71*, 100–121. [[CrossRef](#)]
52. Smith, D.P.; Fletcher, D.L.; Buhr, R.J.; Beyer, R.S. Pekin Duckling and Broiler Chicken Pectoralis Muscle Structure and Composition. *Poult. Sci.* **1993**, *72*, 202–208. [[CrossRef](#)]
53. Ali, M.S.; Kang, G.-H.; Yang, H.-S.; Jeong, J.-Y.; Hwang, Y.-H.; Park, G.-B.; Joo, S.-T. A Comparison of Meat Characteristics between Duck and Chicken Breast. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **2007**, *20*, 1002–1006. [[CrossRef](#)]
54. Xiang, Q.; Zhang, R.; Fan, L.; Ma, Y.; Wu, D.; Li, K.; Bai, Y. Microbial Inactivation and Quality of Grapes Treated by Plasma-Activated Water Combined with Mild Heat. *LWT* **2020**, *126*, 109336. [[CrossRef](#)]
55. Liu, C.; Chen, C.; Jiang, A.; Sun, X.; Guan, Q.; Hu, W. Effects of Plasma-Activated Water on Microbial Growth and Storage Quality of Fresh-Cut Apple. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *59*, 102256. [[CrossRef](#)]
56. Mir, N.A.; Rafiq, A.; Kumar, F.; Singh, V.; Shukla, V. Determinants of Broiler Chicken Meat Quality and Factors Affecting Them: A Review. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 2997–3009. [[CrossRef](#)]
57. Astorga, J.B.; Hadinoto, K.; Cullen, P.; Prescott, S.; Trujillo, F.J. Effect of Plasma Activated Water on the Nutritional Composition, Storage Quality and Microbial Safety of Beef. *LWT* **2022**, *154*, 112794. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.