

Reihe KLIMOPASS-Berichte

Projektnr.: 4500352897 /23

Einsatz von Plasma zur Dekontamination von Agrarprodukten nach der Ernte

von

J. Fütterer, A. Schulz

Finanziert mit Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Klima und
Energiewirtschaft Baden-Württemberg

März 2016

KLIMOPASS

– Klimawandel und modellhafte Anpassung in Baden-Württemberg



Baden-Württemberg

MINISTERIUM FÜR UMWELT, KLIMA UND ENERGIEWIRTSCHAFT

HERAUSGEBER	LUBW Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg Postfach 100163, 76231 Karlsruhe
KONTAKT KLIMOPASS	Dr. Kai Höpker, Daniel Schulz-Engler Referat Medienübergreifende Umweltbeobachtung, Klimawandel; Tel.:0721/56001465, klimopass@lubw.bwl.de
FINANZIERUNG	Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg - Programm Klimawandel und modellhafte Anpassung in Baden-Württemberg (KLIMOPASS)
BEARBEITUNG UND VERANTWORTLICH FÜR DEN INHALT	Julia Fütterer, Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee, Ravensburg Andreas Schulz, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie, Universität Stuttgart
BEZUG	http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/91063/ ID Umweltbeobachtung U81-W03-N17
STAND	März 2016, Internetausgabe März 2016

Verantwortlich für den Inhalt sind die Autorinnen und Autoren. Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter. Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck für kommerzielle Zwecke - auch auszugsweise - ist nur mit Zustimmung der LUBW unter Quellenangabe und Überlassung von Belegexemplaren gestattet.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
ZUSAMMENFASSUNG	7
1 EINLEITUNG	9
2 VORGEHENSWEISE	13
2.1 Kultivierung von <i>Monilia spp.</i> und <i>Botrytis cinerea</i> im Labor	13
2.2 Fruchtsorten und Modellsubstrate	14
2.3 Herstellung von Inokulum und Inokulation der Modellsubstrate	14
2.4 Inokulation von Zwetschgen	15
2.5 Plasmabehandlungen	16
2.6 Fruchtqualitätsanalysen	18
2.7 Bestimmung des Vitamin C -Gehalts	20
2.8 Bestimmung des Polyphenolgehalts	20
2.9 Charakterisierung des Plasmas	21
2.10 Auswertung der Daten und Statistik	22
2.10.1 Univariate Varianzanalyse	22
2.10.2 T-Test	22
3 ERGEBNISSE	23
3.1 Temperaturüberwachung	23
3.2 Wärmeeffekt	24
3.3 Behandlung von <i>M. laxa</i> Sporen auf PET-Folie	24
3.4 Vorversuch zur Plasmabehandlung von Myzel	25
3.5 Vorversuche zur Plasmabehandlung von Konidien	26
3.6 Künstliche Inokulation von Zwetschgen	26
3.7 Plasmabehandlung von Myzel von <i>Monilia laxa</i>	29
3.8 Plasmabehandlung von Konidien von <i>Monilia laxa</i>	31
3.9 Plasmabehandlung von <i>Botrytis cinerea</i>	32

3.10	Plasmabehandlung künstlich inokulierter Zwetschgen	34
3.11	Fruchtqualitätsanalyse plasmabehandelter Zwetschgen	36
3.11.1	Farbe der Fruchthaut	36
3.11.2	Fruchtfleischfestigkeit	37
3.11.3	Säuregehalt	38
3.11.4	Zuckergehalt	38
3.11.5	Vitamin C -Gehalt	39
3.11.6	Polyphenolgehalt	40
3.12	Fruchtqualitätsanalyse plasmabehandelter Erdbeeren	42
3.13	Untersuchungen zu den Wirkmechanismen des Plasmas	44
3.14	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4	LITERATURVERZEICHNIS	48
5	ANHANG	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Mit Sandpapier verletzte Zwetschgenoberfläche.....	15
Abbildung 2. Schematische Darstellung des Mikrowellen-Plasmabrenners.....	16
Abbildung 3. Vorrichtungen zur Plasmabehandlung.....	17
Abbildung 4. Boniturschemata Erdbeeren.....	19
Abbildung 5. Transmissionspektrum von MgF ₂	22
Abbildung 6. Messung der Oberflächentemperatur verwendeter Modellsubstrate.....	23
Abbildung 7. Überprüfung eines möglichen Wärmeeffektes auf <i>M. laxa</i>	24
Abbildung 8. Applikationstechnik und Resultat einer Sporensuspension auf PET-Folie.....	25
Abbildung 9. Vorversuch zur Plasmabehandlung von Myzelsuspension auf PDA.....	25
Abbildung 10. Plasmabehandlung von Konidien, Vorversuch.....	26
Abbildung 11: Inokulation intakter Früchte mit Myzelsuspension.....	27
Abbildung 12. Inokulation intakter Früchte mit Sporensuspension.....	27
Abbildung 13. Vergrößerter Ausschnitt zweier mit Sporensuspension inokulierter Früchte.....	28
Abbildung 14. Inokulierte Zwetschgen, Vergleich von Myzelsuspension und Sporensuspension.....	28
Abbildung 15. Inokulierte Zwetschgen, Vergleich zweier Sporensuspensionen.....	29
Abbildung 16. Plasmabehandlung von <i>M. laxa</i> Myzel, Zeitreihe, Darstellung im Boxplot.....	29
Abbildung 17. Plasmabehandlung von <i>M. laxa</i> Myzel, Zeitreihe.....	31
Abbildung 18. Plasmabehandlung von <i>M. laxa</i> Konidien, Zeitreihe, Darstellung im Boxplot.....	31
Abbildung 19. Kulturen von <i>B. cinerea</i> nach Plasmabehandlungen mit verschiedenen Behandlungszeiten..	32
Abbildung 20. Plasmabehandlung von <i>B. cinerea</i> Myzel, Zeitreihe.....	33
Abbildung 21. Plasmabehandlung von <i>B. cinerea</i> Konidien, Zeitreihe.....	33
Abbildung 22. Wirkung einer 5-minütigen Plasmabehandlung auf Myzel von <i>M. laxa</i> in verschiedenen Abständen zur Plasmaflamme.....	34
Abbildung 23. Temperaturverlauf großer und kleiner Früchte im Vergleich.....	35
Abbildung 24. Temperaturverlauf der Zwetschgenoberfläche.....	35
Abbildung 25. Mittlerer Läsionsdurchmesser von <i>M. laxa</i> auf Zwetschgen.....	36
Abbildung 26. Farbe der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.....	37
Abbildung 27. Fruchtfleischfestigkeit der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.....	37
Abbildung 28. Säuregehalt der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.....	38
Abbildung 29. Zuckergehalt der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.....	39
Abbildung 30. Vitamin C-Konzentration der Sorten Hanita und Hauszwetschge.....	39

Abbildung 31. Gehalt an Hydroxyzimtsäuren 1-10.....	40
Abbildung 32. Gehalt an Hydroxyzimtsäuren, Flavonen und Flavonolen 1-6.....	41
Abbildung 33. Gehalt unbekannter phenolischer Verbindungen Nr. 1, 2, 3.	41
Abbildung 34. Gehalt an Anthocyanen 1 – 3.	42
Abbildung 35. Qualitativer Vergleich unbehandelter und mit Plasma behandelten Erdbeeren.	43
Abbildung 36. Beschädigung der Fruchtoberfläche von Erdbeeren durch die Plasmabehandlung.....	43
Abbildung 37. Fruchtfleischfestigkeit plasmabehandelter Erdbeeren.....	43
Abbildung 38. Zuckergehalt plasmabehandelter Erdbeeren.....	43
Abbildung 39. Säuregehalt plasmabehandelter Erdbeeren.....	43
Abbildung 40. Farbe der Fruchthaut plasmabehandelter Erdbeeren.	44
Abbildung 41. Effekt der Wirkmechanismen des Plasmas auf Myzel von <i>M. laxa</i>	44
Abbildung 42. 5-minütige Plasmabehandlung von <i>M. laxa</i> auf Zwetschge.....	52
Abbildung 43. 10-minütige Plasmabehandlung von <i>M. laxa</i> auf Zwetschge.....	52

Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projektes wurde die grundsätzliche Eignung einer Plasmabehandlung als Nacherntebehandlung gegen *Monilinia spp.* auf Zwetschge und *Botrytis cinerea* auf Erdbeere überprüft. Dabei wurde für die Erzeugung des Plasmas ein Mikrowellenplasmabrenner bei Atmosphärendruck eingesetzt, als Arbeitsgas diente Raumluft. Beispielhaft für die drei vorwiegend im Obstbau vorkommenden *Monilinia* Arten *M. laxa*, *M. fructigena* und *M. fructicola* wurden die Versuche mit *M. laxa* durchgeführt. Sowohl bei *M. laxa* als auch *B. cinerea* wurde versucht, sowohl Sporen als auch Myzel mit einer Plasmabehandlung zu inaktivieren. Für eine vereinfachte Versuchsdurchführung wurden hierfür zunächst Agarplatten als Modellsubstrate eingesetzt, für die praktische Anwendung der Technik wurden zudem Zwetschgen und Erdbeeren mit Plasma behandelt, um eine Wirksamkeit der Methode auf der Frucht zu zeigen und einen möglichen Einfluss der Wirkmechanismen auf diverse Fruchtqualitätsparameter zu überprüfen.

Bereits nach einer Behandlungsdauer von 5 Minuten konnte eine signifikante Abtötung von *M. laxa* Myzel nachgewiesen werden, nach 10 Minuten wurde eine Reduktion von über 90 % erreicht. Dabei zeigte die Inaktivierungskurve über den Behandlungszeitraum von 10 Minuten einen charakteristischen dreiphasigen Verlauf. Im Gegensatz zu Myzel haben sich Sporen von *M. laxa* als widerstandsfähiger erwiesen. Auch nach 10 Minuten Behandlungsdauer konnte keine signifikante Reduktion der Sporenkeimung erzielt werden.

Bei der Plasmabehandlung von Myzel von *Botrytis cinerea* wurde das Wachstum bereits nach 5 Minuten teils vollständig gehemmt. Signifikante Effekte waren hier schon nach 2,5 Minuten sichtbar. Im Gegensatz dazu konnte nach der Plasmabehandlung von Sporen erst nach einer Behandlungsdauer von 5 Minuten ein inhibierender Effekt auf die Sporenkeimung beobachtet werden. Zudem war auch nach 10 Minuten Behandlungsdauer noch Sporenkeimung und Myzelwachstum zu beobachten. Demnach zeigen auch Sporen von *B. cinerea* eine erhöhte Widerstandsfähigkeit als das Myzel des Graufäuleerregers.

Mit dem für die Versuche eingesetzten Plasmabrenner konnte eine Erwärmung der Substrate während einer Behandlung nicht verhindert werden. Dabei haben die als Modellsubstrate eingesetzten Agarplatten jedoch eine gute Wärmekapazität gezeigt. Zwetschgen und Erdbeeren mussten dagegen gekühlt eingesetzt werden, um ein zu starkes Erwärmen der Fruchtoberfläche zu vermeiden.

Für eine künstliche Inokulation von Zwetschgen wurde die Fruchthaut verletzt, um ein Eindringen des Erregers in das Fruchtfleisch und eine Infektion zu ermöglichen. Da der Erreger im Fruchtfleisch für die oberflächlich wirkenden Bestandteile des Plasmas nicht mehr erreichbar war, war die Plasmabehandlung gegen die Infektionen auf der Frucht nicht wirksam.

Die Fruchtqualitätsanalysen plasmabehandelter Zwetschgen haben keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle ergeben. Untersucht wurden die Farbe der Fruchthaut, die Fruchtfleischfestigkeit sowie der Gehalt an Zucker, Säure, Vitamin C und Polyphenolen.

Die Lagerfähigkeit plasmabehandelter Erdbeeren wurde durch die Plasmabehandlung ebenfalls nicht beeinträchtigt. Auch die Fruchtqualitätsparameter Festigkeit, Zucker- und Säuregehalt sowie die Farbe der Fruchtoberfläche wurden dadurch nicht verändert. Vor allem der Transport der Früchte und ihre Lagerung haben Auswirkungen auf die optische Fruchtqualität hervorgerufen. Durch den Transport wurden Druckstellen

verursacht, welche die Attraktivität der Früchte deutlich reduziert haben. Durch die Wärme während der Plasmabehandlung wurden vor allem die Kronblätter durch Austrocknen geschädigt.

Durch das Abschirmen der im Plasma vorwiegenden Radikale mithilfe von MgF_2 -Plättchen während einer Plasmabehandlung von Myzel konnte gezeigt werden, dass die Wirkung des Plasmas auf einer Synergie aus UV-Strahlung und Radikalen beruht.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die beschriebene Methode eine sehr präzise Entwicklung und Abstimmung auf den Erreger und das Substrat erfordert. So kann beispielsweise die Wirkung des Plasmas auf Sporen durch die Anpassung der Parameter unter Umständen verbessert werden. Die gute Wirkung gegen Myzel von *Monilinia laxa* sowie Sporen und Myzel von *B. cinerea* sowie die Schonung der Fruchtqualität plasmabehandelter Zwetschgen und auch der Erdbeeren hat jedoch auch die grundsätzliche Praxistauglichkeit der Methode bewiesen.

1 Einleitung

Der Klimawandel führt zu einem vermehrten Auftreten von phytopathogenen Pilzen und zu idealen Bedingungen für die Ausbreitung von Quarantäneorganismen die beispielsweise aus Asien und Amerika nach Europa gelangen (Anderson *et al.*, 2004). Dies stellt für die Landwirtschaft und besonders für den Pflanzenschutz eine besondere Herausforderung dar. Gleichzeitig soll der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln reduziert werden, um die Umwelt nicht weiter zu belasten.

Monilia spp. und *Botrytis cinerea* gehören neben *Gloeosporium spp.* und *Penicillium spp.* zu den bedeutendsten Erregern von Fruchtfäulen. Von beiden Erregern wird ein vermehrtes Auftreten in der Zukunft erwartet. Der Quarantäneorganismus *Monilia fructicola* wurde bereits vereinzelt in Baden-Württemberg und der Schweiz beobachtet (Hinrichs-Berger und Müller, 2010; Patocchi *et al.*, 2009). In den südlichen Ländern Europas ist er bereits fest etabliert. In Griechenland wurden beispielsweise ausschließlich *M. laxa* und *M. fructicola* mit Fruchtfäulen an Pfirsich, Aprikose, Süßkirsche und Zwetschgen in Verbindung gebracht, *M. fructigena* konnte nicht nachgewiesen werden (Papavasileiou *et al.*, 2015). Außerdem wurde auf Pfirsich und Zwetschge ausschließlich die Art *M. fructicola* nachgewiesen. Auch in Spanien wurden in Pfirsich-Anlagen *M. laxa* und *M. fructicola*, jedoch nicht *M. fructigena* nachgewiesen (Villarino *et al.*, 2012). Es wird erwartet, dass sich dieser Erreger durch eine erhöhte Durchschnittstemperatur weiter in Europa ausbreiten kann (van Leeuwen *et al.*, 2001). Dann werden nicht nur während der Vegetationsperiode am Baum, sondern ebenso nach der Ernte vermehrt Infektionen der Früchte erwartet. Bis zur Ausbildung sichtbarer Symptome kann der Pilz latent auf der Frucht vorliegen und erst bei optimalen Bedingungen (Temperatur, Verfügbarkeit von Wasser, Reifezustand der Frucht, Verletzungen der Fruchthaut) zur Fruchtfäule führen (Adaskaveg *et al.*, 2000). Obwohl also die Kolonisierung der Fruchtoberfläche durch den Pilz bereits am Baum stattgefunden hat, manifestiert sich die Infektion häufig erst nach der Ernte (Manganaris *et al.*, 2008). Deshalb können auch in allen Phasen nach der Ernte (Transport, Lagerung, Verkauf) noch bedeutende Verluste von reifen Früchten auftreten (Byrde und Willetts, 1977). Pilze der Gattung *Monilia* infizieren verschiedene oberirdische Pflanzenteile von kultivierten Obstbäumen sowie vielen anderen Pflanzen der Familie der *Rosaceae*. Im Obstbau sind die Erreger vor allem für Kern- und Steinobst bedeutsam (Siegfried und Viret, 2010). Die wichtigsten kommerziell angebaute Obstarten, die als Wirte für *M. laxa*, *M. fructigena* und *M. fructicola* dienen, sind die Zwetschge (*Prunus domestica* L.), der Apfel (*Malus domestica* Borkh.), die Birne (*Pyrus communis* L.), die Quitte (*Cydonia oblongata* Mill.), Pfirsich und Nektarine (*Prunus persica* (L.) Batsch), die Aprikose (*Prunus armeniaca* L.), die Süßkirsche (*Prunus avium* L.) und die Sauerkirsche (*Prunus cerasus* L.) sowie die Mandel (*Prunus amygdalus* Batsch), (Byrde und Willetts, 1977; Holb, 2008).

Botrytis cinerea verursacht weltweit große Verluste in mehr als 200 Pflanzenarten (Williamson *et al.*, 2007). In der Regel infiziert der Pilz junge Teile der Wirtspflanze (beispielsweise die Blüte) wo er bis zur Verfügbarkeit optimaler Bedingungen latent verbleibt. Aus diesem Grund treten Symptome häufig erst nach der Ernte auf ursprünglich gesund geernteten Früchten auf. Fäulnissymptome nach der Ernte, verursacht durch *B. cinerea*, können dann auf verschiedenen Pflanzenorganen auftreten. Dabei sind Gemüse (beispielsweise Kohl, Salat, Brokkoli und Bohnen) und Kleinfrüchte (Trauben, Erdbeeren, Himbeeren und Brombeeren) am häufigsten betroffen. Das übliche Erscheinungsbild sind Weichfäulen und die schnelle Bildung von grauen Konidienmassen. Bei Erdbeeren gehört *B. cinerea* neben *Rhizopus spp.* zu den Haupterregern von Fäulen nach der Ernte und im Lager. Dabei finden die Infektionen auch hier bereits zur Blüte statt oder später durch den Kontakt mit bereits infizierten Früchten (Reddy *et al.*, 2000). In der Regel sollten ausreichend Fungizide

zur Verfügung stehen, um die Symptombildung zu verhindern. Da *B. cinerea* jedoch ein genetisch variabler Organismus ist, bestehen bereits zahlreiche Resistenzen, wodurch die Fungizide ihre Wirksamkeit verlieren (Williamson *et al.*, 2007).

Eine Möglichkeit, den Verlusten nach der Ernte ohne Einsatz von Pflanzenschutzmitteln Herr zu werden und die Resistenzen der Organismen zu umgehen, ist die Anwendung von Plasma bei der Kommissionierung der Früchte. Eine Plasmabehandlung ist eine sehr energieeffiziente Methode zur oberflächlichen Dekontamination von Agrarprodukten. Die Wirkmechanismen entfalten sich direkt vor Ort und es gibt keine Rückstände. Dadurch entfallen Nachreinigung und Entsorgung. Wird die Plasmaanlage mit Strom aus erneuerbaren Energien betrieben, ist sie zu 100 % CO₂-neutral. Aus diesen Gründen sollte in Rahmen dieses Projektes eine bestehende Plasmatechnologie auf ihre Wirksamkeit gegen Phytopathogene nach der Ernte überprüft werden. Als Modell mit Anwendungscharakter wurde hierfür der Fokus auf die Erreger *Monilia spp.* und *Botrytis cinerea* gelegt. Die Versuche wurden mit Sporen und Myzel der Erreger in Zusammenarbeit mit dem Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) an der Universität Stuttgart durchgeführt. Ein am IGVP bestehender Aufbau einer Plasmaquelle wurde für die projektspezifischen Anwendungen umgebaut und durch Diagnosetechniken für die Plasmacharakterisierung erweitert. Es wurde dann eine Plasmacharakterisierung durchgeführt, um die spezifischen Plasmaparameter wie Leistung, Gasflüsse und Gasmanagement zu definieren. In Versuchen mit Modellsubstraten (Agarplatten und Kunststofffolien) sollte durch die Behandlung mit Plasma eine ausreichende Reduktion der Erreger sowohl bei Myzel als auch bei Sporen hervorgerufen werden. Bei Myzel bedeutete diese eine signifikante Wachstumsreduktion im Vergleich zu Kontrollen (MS 1), bei Sporen eine Reduktion der Keimfähigkeit um 99,99 % (MS 2). Für die Weitervermarktung der Früchte nach der Plasmabehandlung ist es wichtig, dass die Fruchtqualität durch die Behandlung nicht beeinträchtigt wird. Ein Vergleich der Fruchtqualität behandelter Früchte mit unbehandelten am KOB sollte dies bestätigen. Der Schwerpunkt lag hierbei auf den Parametern Optik, Fruchtfleischfestigkeit, Zucker- und Säuregehalt sowie der Vitamin C Konzentration. Am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München wurde zusätzlich eine mögliche Auswirkung der Plasmabehandlung auf den Gehalt sekundärer Pflanzenmetabolite (Polyphenole) in Zwetschgen untersucht (MS 3). Im Anschluss an die Versuche mit Modellsubstraten und die Analyse der Fruchtqualität wurden die daraus gewonnenen Erkenntnisse auf das natürliche Substrat umgesetzt um die Wirksamkeit auf der Frucht nachzuweisen. Hierzu wurden Zwetschgen gezielt mit *Monilinia laxa* inokuliert und anschließend behandelt. Die Früchte wurden nach der Plasmabehandlung unter definierten Bedingungen gelagert und etwa eine Woche lang auf Symptomentwicklung beobachtet. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollfrüchten sollte dann ein signifikant geringerer Befall beobachtet werden. Ursprünglich war geplant, auch Erdbeeren mit *Botrytis* zu inokulieren und die Infektion durch eine Plasmabehandlung zu verhindern. Da jedoch bereits bei den Untersuchungen zu den Fruchtqualitätsparametern deutlich negative Einflüsse der Plasmabehandlung auf die Früchte sichtbar waren, wurden keine Versuche zur Abtötung von *B. cinerea* auf der Frucht durchgeführt. Die Details hierzu sind in Abschnitt 3 aufgeführt.

Plasma kann nach fest, flüssig und gasförmig als vierter Aggregatzustand beschrieben werden (Leins, 2010). Es wird erzeugt, indem einem Gas durch Anlegung einer Spannung oder in Form elektromagnetischer Wellen wie beispielsweise Mikrowellen, Energie zugeführt wird (Janzen, 1992). Geladene Teilchen können dadurch Energie gewinnen und durch energiereiche Stöße im Gas werden die neutralen Gasteilchen ionisiert. Dadurch treten Elektronen und positive Ionen auf. Das Ergebnis ist ein aktiviertes Gas, welches aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Partikel-Spezies (Molekülen, Atomen, Ionen, Elektronen und Radikalen) besteht (Leins, 2010). Diese Spezies entstehen im Plasma durch zwei hauptsächliche Mechanismen: Zum einen die Ionisation von Molekülen zu Elektronen und Ionen, zum anderen die Dissoziation von Gasmolekü-

len, wodurch Radikale wie beispielsweise Sauerstoff- und Stickstoffradikale entstehen. Desweiteren werden Moleküle und Atome angeregt und geben infolge dessen Strahlung unter anderem im UV- und Vakuum UV (VUV)-Bereich ab. Im Allgemeinen handelt es sich bei Plasmen demnach um vollständig oder teilweise ionisierte Gase.

Je nach Technik für ihre Erzeugung, können Plasmen in thermische und nicht thermische Plasmen unterteilt werden (Janzen, 2011). Können genügend Stöße zwischen allen Plasmapartikeln stattfinden, so stellt sich ein vollständiges thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Elektronen, Ionen und Neutronen ein. Das bedeutet, dass Elektronen und Ionen des Plasmas in etwa dieselbe Temperatur und Energie besitzen. Die Stoßfrequenz ist hoch, wodurch die Elektronen ihre Energie zugunsten der Ionen abgeben können und so zur Erwärmung verschiedener Moleküle im thermodynamischen Gleichgewicht beitragen. In diesem Fall spricht man von Gleichgewichtsplasmen mit Temperaturen von 10^3 - 10^4 K und einem hohen Ionisierungsgrad. Kann sich kein vollständiges thermodynamisches Gleichgewicht einstellen, beispielsweise unter Niederdruck, ist die Rede von einem nicht-thermischen bzw. Nichtgleichgewichtsplasma. In diesem Fall fehlen den Elektronen aufgrund ihrer geringen Dichte die Stoßpartner und sie übertragen bedingt durch das Massenverhältnis nur einen Bruchteil ihrer kinetischen Energie auf die schweren Gasteilchen. Dadurch liegt die Elektronentemperatur bei etwa 10^4 K, wohingegen die Temperatur von Ionen und Neutronen in etwa Raumtemperatur aufweist (Surowsky *et al.*, 2014a). Der Ionisationsgrad dieser Plasmen ist relativ gering. Bei Atmosphärendruck können nicht-thermische Plasmen durch eine Vielzahl elektrischer Entladungen wie Koronaentladungen (Raizer und Allen, 1997), dielektrisch behinderte Entladungen (DBE; Ehlbeck *et al.*, 2011) und Plasmajets (Schütze *et al.*, 1998) erzeugt werden.

Den nicht-thermischen bzw. Niedrigtemperatur-Plasmen werden auch quasi-Gleichgewichtsplasmen zugeordnet. Diese werden in der Regel mit Plasmabrennern und Mikrowellengeräten erzeugt (Nehra *et al.*, 2008). Ein solches Plasma wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Erzeugt wurde es bei Atmosphärendruck, wobei die Energie durch eine Mikrowelle zugeführt wurde. Dieses Mikrowellenplasma kann im Kern Temperaturen bis 3.600 K erreichen. Aus diesem Grund wurden die Plasmabehandlungen indirekt mit dem effluenten Plasmagas (Afterglow) durchgeführt, um eine übermäßige Erwärmung der Substrate zu vermeiden.

Bei einer direkten Anwendung des Plasmas tragen in der Regel vor allem die kurzlebigen Radikale wie beispielsweise das Hydroxylradikal zur Wirkung bei, da auch diese das Substrat erreichen. Im effluenten Plasmagas sind dagegen vor allem langlebige Radikale wie Ozon oder Stickstoffmonoxid enthalten. Gleichzeitig nimmt bei größerem Abstand zum Substrat die Dichte an reaktiven Sauerstoffspezies durch den Kontakt des Plasmagases mit der Umgebungsluft zu (Surowsky *et al.*, 2014a).

Durch die verschiedenen Möglichkeiten ein Plasma zu erzeugen, ergeben sich verschiedene Plasmacharakteristika. Die definierenden Parameter sind dabei die Art der verwendeten Plasmaquelle (Mikrowellenbrenner, DBE, Plasmajet, etc.) und die Art der Plasmabehandlung (direkt oder indirekt), das Arbeitsgas (Luft, reine Gase wie Sauerstoff und Stickstoff, Edelgase, sowie spezifische Gasgemische, etc.), der Umgebungsdruck (Atmosphärendruck oder Niederdruck), die Art der eingesetzten Energiequelle und der Gasfluss. Diese Parameter definieren die Plasmatemperaturen, den Ionisationsgrad, die Elektronendichte, die Elektronentemperatur, die Konzentration an reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies sowie die auftretende UV-Strahlung. Aus diesen Eigenschaften ergibt sich wiederum eine desinfizierende Wirksamkeit eines Plasmas (Surowsky *et al.*, 2014a; Niemira und Gutsol, 2011).

Durch die beschriebenen Eigenschaften eines Plasmas kann dieses für eine Vielzahl von Anwendungen genutzt werden. So können mit einer Plasmabehandlung beispielsweise die Eigenschaften von Materialoberflächen verändert werden. Diese Möglichkeit wird in verschiedenen Bereichen von Industrieprozessen erfolgreich genutzt. In der Halbleiterindustrie werden Plasmen für das Ätzen von Oberflächen eingesetzt (Janzen, 1992). Außerdem können Plasmen zur Abscheidung von Molekülen auf Oberflächen angewendet werden, wodurch unter anderem korrosions- und verschleißfeste Schichten oder Halbleiterschichten aufgetragen werden können (Janzen, 1992). Durch die Aktivierung von Oberflächen mithilfe von Plasmen, können Oberflächeneigenschaften verändert werden, um beispielsweise die Haftung von Lacken und Klebern zu verbessern (Leins *et al.*, 2012). Bewirkt wird diese Aktivierung durch die Bildung polarer Gruppen auf der Substratoberfläche durch atomaren Sauerstoff. Die Folge ist eine erhöhte Oberflächenspannung, Haftfähigkeit und Benetzbarkeit. In der Medizin werden Plasmaprozesse bereits erfolgreich in Sterilisationsvorgängen und in therapeutischen Maßnahmen eingesetzt oder in zahlreichen Forschungsprojekten dazu untersucht (Arndt *et al.*, 2013; Gorynia *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2014). Zu den Anwendungsbereichen zählen unter anderem die Oberflächenaktivierung von Implantaten (Gombotz und Hoffmann, 1987), die Sterilisation von medizinischen Instrumenten (Ehlbeck *et al.*, 2011) oder die Heilung von Wunden (Tiede *et al.*, 2014) und die gezielte Abtötung von Krebszellen (Vandamme *et al.*, 2010). Für die genannten Anwendungen werden die unterschiedlichen, im Plasma auftretenden Komponenten genutzt. Die Hauptwirkmechanismen des Plasmas entstehen in diesem Fall durch die UV-Strahlung und die Radikale im Plasma (Ehlbeck *et al.*, 2011). Dabei liegt der Vorteil einer Plasmabehandlung in der synergistischen Wirkung der beschriebenen Eigenschaften (Weltmann *et al.*, 2012).

Ziel des Projektes war der Nachweis der Wirksamkeit des Plasmas gegen phytopathogene Pilze. Als Nutznießer dieses Projektes stehen die Obstbauern und Erzeugerorganisationen in Baden-Württemberg im Vordergrund. Aufgrund der herausragenden Relevanz, wurde die Wirksamkeit des Plasmas an den Organismen *Monilia spp.* (auf Zwetschge) und *Botrytis cinerea* (auf Erdbeere) gezeigt. Wir erwarten jedoch einen Transfer der Erkenntnisse auf weitere Phytopathogene wie *Gloeosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* sowie weitere Bereiche der Landwirtschaft wie Acker- und Gemüsebau. Vor allem bei Kirschen, im Beerenanbau sowie im Gemüsebau soll der Einsatz von Plasma nach der Ernte die Haltbarkeit des Produktes deutlich verbessern. Für die Zukunft ist geplant, eine solche Plasmabehandlung bei der Kommissionierung der Früchte in den Arbeitsablauf zu integrieren. Dabei muss dieser Schritt optimal angepasst werden, um eine Umsetzung in die Praxis realistisch zu gestalten.

2 Vorgehensweise

2.1 KULTIVIERUNG VON *MONILIA SPP.* UND *BOTRYTIS CINEREA* IM LABOR

Für alle Versuche mit Myzel und Sporen wurden das *Monilia laxa* Isolat M1D2E1 sowie das *Botrytis cinerea* Isolat 7-33 L5D2E7 verwendet. Beide Isolate stammen aus der Sammlung des Fachgebiets Phytopathologie an der Universität Hohenheim (UoH). Mit beiden Isolaten konnten zuverlässig Sporen gewonnen werden. Zudem handelt es sich im Gegensatz zu *Monilia fructicola* bei *M. laxa* nicht um einen Quarantäneorganismus, was die Arbeit an den verschiedenen Versuchsstandorten KOB und IGVP erleichtert hat. Die Inkubation der Kulturen erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei 23 °C mit einer Lichtperiode von 14 Stunden. Diese Bedingungen wurden sowohl für die Inkubation der Vorratskulturen als auch für die Kultivierung von Versuchs- und Sporulationskulturen gewählt. Sofern nicht anders beschrieben, gelten die im Folgenden beschriebenen Methoden sowohl für Versuche mit *M. laxa* als auch für die mit *B. cinerea* durchgeführten Versuche.

Alle Kulturen wurden auf Kartoffel-Dextrose-Agar-Platten (PDA, Difco™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) kultiviert und vermehrt. Auch die Plasmabehandlung von Myzel und Sporen wurde auf PDA durchgeführt. Dieser Agar ist klar und durchsichtig und eignet sich gut für die Auswertung der in Abschnitt 2.6 beschriebenen Versuche. Um Myzel für die Herstellung einer Myzelsuspension zu gewinnen, wurden *M. laxa* und *B. cinerea* in 50 ml Flüssigmedium (Kartoffel-Dextrose-Bouillon (PDB, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) kultiviert. Alle genannten Materialien und Lösungen wurden vor Verwendung für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die Arbeiten wurden in der sterilen Umgebung einer Sicherheitswerkbank (Kojair Tech OY, Vilppula, Finnland) durchgeführt.

Für die Anregung der Konidienproduktion, wurden die Kulturen nach einer von Tamm und Fluckiger (1993) beschriebenen Methode kultiviert: Aprikosenagar (AA), in kleinen Petrischalen (Ø 60 mm; Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) wurde mit Agarblöcken oder 20 µl Sporensuspension aus einer Kultur inokuliert und offen in einer Glasschale inkubiert. Dabei war die Glasschale etwa 1 cm hoch mit gesättigter, steriler Kochsalzlösung gefüllt. Die Deckel der Petrischalen dienten dabei als Sockel für die Agarplatten. Um eine hohe Luftfeuchtigkeit in der Glasschale zu erreichen, wurde diese mit Glasdeckel und Parafilm luftdicht verschlossen. Konidien wurden in der Regel nach 7 Tagen geerntet.

Zur Ernte der Konidien wurden die Agarplatten aus der Glasschale genommen und mit 5 ml steriler Ringerlösung geflutet. Die Suspension der hydrophoben Sporen wurde erleichtert, indem der Lösung 0,1 % v/v Tween® 20 (Ringerlösung + Tween) zugesetzt wurden. Durch vorsichtiges Schaben mit einer Lanzettadel und Schwenken der Platten wurden die Konidien gelöst. Für die Gewinnung einer reinen Sporensuspension ohne Myzelfragmente wurde die Suspension durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 40 µm (Merck Millipore Ltd., Darmstadt) filtriert. Zur Langzeitlagerung wurde die Sporensuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bei 8.609 rcf für 2 Minuten zentrifugiert und die Ringerlösung durch 1 ml Einfriermedium für Konidien (nach Wirsal *et al.*, 2001) ersetzt. Mithilfe einer Thoma-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) wurde vor dem Einfrieren die Anzahl der Konidien pro ml der gewonnenen Suspension bestimmt. Um Schäden beim Gefriervorgang zu verhindern, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert. Ebenso verfahren wurde mit Myzelkulturen für die dauerhafte Lagerung der Organismen. Myzelstücke aus Flüssig-

oder Plattenkulturen wurden hierfür in 25 %igem Glycerin (Einfríermedium für Myzel nach Marquenie *et al.*, 2003) bei -80 °C aufbewahrt.

2.2 FRUCHTSORTEN UND MODELLSUBSTRATE

Für die Plasmabehandlung von Myzel und Konidien wurden PDA Platten als Modellsubstrate verwendet. Da Zwetschgen und Erdbeeren nicht das ganze Jahr über verfügbar sind, sollten diese Substrate zunächst den grundsätzlichen Nachweis einer Abtötung von *M. laxa* und *B. cinerea* ermöglichen. Zudem war auf diese Weise eine schnelle und einfache Versuchsdurchführung möglich. Die Platten wurden jeweils durch Ausplattieren oder Auftropfen einer Myzel- oder Sporensuspension inokuliert. Der Nachweis einer Plasmawirkung erfolgte durch die Bestimmung der Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KbE), welche sich aus den vereinzelt auf der Platte vorliegenden Hyphen oder Konidien bildeten. Diese wurden mit der Anzahl KbE unbehandelter Kontrollen verglichen. Nachdem bei *B. cinerea* festgestellt wurde, dass einzelne Sporen oder Hyphen nicht in kleinen runden Kolonien sondern weitflächig und dünn wachsen, sodass einzelne Kolonien nicht zu unterscheiden sind, wurde die Wirkung des Plasmas folgendermaßen ermittelt. 50 µl der Myzel- oder Sporensuspension wurde auf Agar aufgetropft und nach dem Trocknen die Plasmabehandlung durchgeführt. Die Plasmawirkung wurde ermittelt indem der Myzeldurchmesser im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit einem herkömmlichen Lineal gemessen wurde.

Als zusätzliches Modellsubstrat für Sporen wurde die Eignung einer PET-Folie überprüft. Verwendet wurde die PET Folie optimont® (Bleher, Ditzingen) mit einer Stärke von 175 µm. Eine Folie bietet den Vorteil, dass die Sporen darauf vollkommen trocken vorliegen. Dadurch wird eine vorzeitige Keimung der Sporen verhindert. Zudem besteht die Vermutung, dass die Wirkung des Plasmas auf einem trockenen Substrat effizienter ist, da kein abschirmender Feuchtigkeitsfilm vorhanden ist, die Sporen nicht in das Substrat einsinken können und so für das Plasma nicht mehr erreichbar sind. Um die Sporen auf die Folien aufzubringen, wurde eine Airbrush Pistole (Conrad Electronic SE, Hirschau) verwendet, welche mittels Druckluft einen dünnen Sporenfilm auf die Folien aufträgt. Nach der Plasmabehandlung wurden die Sporen mit steriler Ringerlösung (+Tween) durch Schütteln in einem sterilen Flüssigprobenbeutel von der Folie abgelöst. Durch Ausplattieren der so gewonnenen Sporensuspension auf PDA konnten nach 2-3 Tagen Inkubation einzelne KbE gezählt werden. Diese Versuche wurden ausschließlich mit Sporen von *M. laxa* durchgeführt.

Für Versuche mit Zwetschgen wurden die in der Obstanlage des KOB kultivierten Sorten Hanita, Katinka, Hauszwetschge und Hanka verwendet. Je nach Verfügbarkeit wurden die Früchte frisch geerntet, im Kühllager zwischengelagert oder unter kontrollierter Atmosphäre (O₂: 1-2 kPa; CO₂: > 15 kPa; Temperatur: 1,0 °C) für einige Wochen aufbewahrt. Durch den unterschiedlichen Reifezeitpunkt dieser Sorten und die Lagermöglichkeiten, waren von Juli bis November Früchte für Versuche verfügbar.

Für Versuche mit Erdbeeren wurden bei Obstbauer Haller aus Horgenzell die verfügbaren Sorten einen Tag vor der Plasmabehandlung gekauft. Die Früchte wurden dann über Nacht bei einer Temperatur von 6 °C zwischengelagert.

2.3 HERSTELLUNG VON INOKULUM UND INOKULATION DER MODELLSUBSTRATE

Eine Myzelsuspension wurde aus einer Flüssigkultur hergestellt, die etwa 7-14 Tage in 50 ml PDB kultiviert wurde. Dafür wurde das Myzel mithilfe zweier Pinzetten in kleinere Stücke gezupft. Diese wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 5 ml Ringerlösung überschichtet. Mithilfe eines Ultra-Turrax® (t10 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen) wurden die Myzelstücke bei maximaler Umdrehungszahl für etwa 30 Sekunden homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 10 ml Ringerlösung wurde das Homogenat in

drei Schritten gefiltert, um möglichst kleine Hyphenfragmente einheitlicher Größe zu gewinnen: 1. Entfernen grober Stücke mithilfe von Verbandmull (keine Herstellerangaben und Produktdetails verfügbar), 2. Weitere Verfeinerung der Suspension durch Filtration durch Gaze mit einer Porengröße von 100 µm (Ehlert und Partner GbR, Niederkassel-Reidt), 3. Gewinnung der kleinsten Fragmente durch Filtration der Suspension durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 40 µm (Merck Millipore Ltd., Darmstadt). Für die Reproduzierung der Anzahl der Hyphenfragmente in einer Suspension wurde die optische Dichte der Myzelsuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) in einem Spektralphotometer (Hitachi Ltd., Corporation, Tokio, Japan) in Duplikaten gemessen. Der Mittelwert diente als Richtwert für den Gehalt an Hyphenfragmenten bei der Herstellung der Suspensionen. Der OD-Wert wurde wenn nötig durch Verdünnen auf einen Wert von etwa 0,8 eingestellt. Von der Suspension wurden je nach Plattengröße 100 µl, beziehungsweise 50 µl mithilfe eines Trigalskispatels ausplattiert. Bis zur Plasmabehandlung wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank gelagert, um das Wachstum der Hyphen zu hemmen.

Zur Inokulation eines Modellsubstrates mit Konidien wurde ein Aliquot einer tiefgefrorenen Sporensuspension aufgetaut und bei 8.609 rcf für 2 Minuten zentrifugiert. Das Einfriermedium wurde abgenommen und durch ein entsprechendes Volumen Ringerlösung + Tween ersetzt. Mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer wurde erneut die Anzahl Konidien pro ml Lösung bestimmt. Anhand dessen wurde eine entsprechende Verdünnung der Sporensuspension hergestellt. Von dieser wurden pro Platte 50 µl mithilfe eines Trigalskispatels ausplattiert oder mittels Airbrushpistole aufgesprüht. Um ein vorzeitiges Keimen der Konidien zu verhindern, wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt und die fertige Sporensuspension über Nacht im Kühlschrank gelagert. Das Ausplattieren auf PDA wurde kurz vor der Plasmabehandlung vor Ort am IGVP durchgeführt. Für die Schaffung steriler Bedingungen wurde hier die Arbeitsfläche mit 70 % Ethanol gesäubert und das Ausplattieren im Bereich einer Gasflamme durchgeführt.

2.4 INOKULATION VON ZWETSCHGEN

Die Inokulation von Zwetschgen wurde sowohl mit Myzelsuspension als auch mit Sporensuspension aus *Monilinia laxa* Kulturen durchgeführt. Dazu wurden die Früchte zunächst in einem Bad aus Leitungswasser gewaschen und anschließend für 10 Minuten in 70 % Ethanol oberflächensterilisiert. Nach der Trocknung der Früchte unter der Sterilbank wurde eine Stelle der Fruchthaut durch mehrmaliges (4 - 5 mal) Abreiben mit einem schmalen Streifen Sandpapier (Körnung 80, Hersteller unbekannt) aufgeraut. Dabei wurde ein leichter Druck auf die Frucht ausgeübt. Durch das Abreiben wurden deutliche Rillen in der Fruchthaut sichtbar, teilweise trat auch etwas Fruchtsaft aus (Abbildung 1).



Abbildung 1. Mit Sandpapier verletzte Zwetschgenoberfläche. Die Fruchthaut wurde durch 4 - 5 maliges Abreiben mit Sandpapier aufgeraut, sodass deutliche Rillen in der Fruchthaut und das Fruchtfleisch sichtbar wurden.

Zusätzlich wurde die Infektion an intakten Früchten getestet. Um eine weitere Verbesserung der Infektionsbedingungen zu erzielen, wurden Sporen vor der Inokulation in einer definierten Zuckerlösung vorkonditioniert. Dieser Ansatz stammt aus einem Protokoll für optimale in-vitro Infektionsbedingungen für *Botrytis*

cinerea auf intakten Pflanzenteilen (Benito *et al.*, 1998). Demnach sind Glukose und Phosphat essentielle Bestandteile eines Inokulums für eine erfolgreiche Infektion. Nach der Inokulation und einer darauf folgenden Plasmabehandlung wurden die Früchte bei Raumtemperatur und Tageslicht (14 h) bis zur Symptombildung (etwa 7 Tage) in sterilen Kunststoffbehältern inkubiert. Die Auswertung erfolgte qualitativ und fotografisch sowie quantitativ durch Messung des Läsionsdurchmessers.

2.5 PLASMABEHANDLUNGEN

Die Plasmabehandlungen wurden mit einer Atmosphärendruck-Mikrowellen-Plasmaquelle durchgeführt, die am IGVP an der Universität Stuttgart entwickelt wurde (Abbildung 2; Leins *et al.*, 2012; Leins *et al.*, 2015). Die beschriebenen Bauteile des Plasmabrenners stammen von der Firma Muegge GmbH in Reichelsheim. Der Brenner basiert auf einem axial symmetrischen Resonator, welchem über einen Hohlleiter Mikrowellen mit einer Frequenz von 2,45 GHz zugeführt werden. Hat sich ein ausreichend starkes elektrisches Feld gebildet, zündet das Plasma ohne zusätzliche Zündungsvorrichtungen. Die Mikrowelle wird dabei von einem Magnetron erzeugt. Um das Magnetron zu schützen, wird die reflektierte Mikrowellenenergie in einem Zirkulator mit Wasserlast abgefangen, während durch einen 3-Stift-Tuner die vorwärtsgerichtete Energie maximiert wird. Das Plasma wird durch ein für die Mikrowellen durchlässiges Quarzrohr begrenzt. Durch eine Metalldüse im Zentrum des Resonators wird das Arbeitsgas zugeführt. Zusätzliche tangentielle Luftzufuhr lokalisiert das Plasma in der Mitte des Quarzrohres und gewährleistet einen stabilen Betrieb.

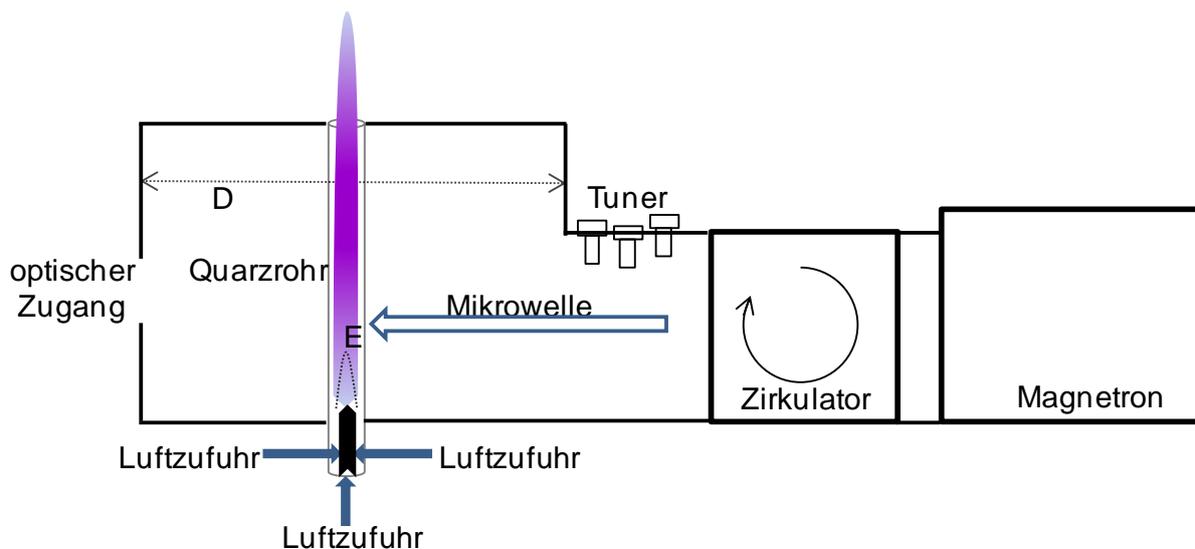


Abbildung 2. Schematische Darstellung des Mikrowellen-Plasmabrenners.

Der Durchmesser des Resonators (D) ist exakt auf die Mikrowellenfrequenz abgestimmt, sodass die Mikrowelle darin hin und her schwingt. An der Düsen Spitze im Zentrum des Resonators bildet sich ein elektrisches Feld (E), welches zur Zündung des Plasmas führt. Die Plasmaflamme erreicht im Kern Temperaturen bis 3.500 K (Leins, 2010). Im austretenden Plasma wurden dann noch Temperaturen von einigen 100 °C bis 1.000 °C gemessen. Aus diesem Grund wurde für die Behandlung der inokulierten Substrate nicht die Flamme selbst sondern das effluente Plasmagas (Afterglow) oberhalb der Flamme verwendet. Damit wird die unsichtbare Wolke aus Plasmamolekülen und Strahlung bezeichnet, die sich oberhalb der Plasmaflamme ausdehnt. Im Bereich des Afterglow wurden die jeweiligen Substrate an speziellen Halterungen „kopfüber“ fixiert, um den Kontakt mit den Molekülen zu ermöglichen. Dabei betrug der Abstand zwischen Substratoberfläche und der Düse 23 cm. Die freistehende Plasmaflamme erreicht eine Höhe von wenigen Zentimetern. Alle im Folgenden beschriebenen Plasmabehandlungen wurden, sofern nicht abweichend beschrieben,

unter identischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde als Arbeitsgas Raumluft mit $\Phi = 20 \text{ slm}$ (20 % bei 1 bar Vordruck) zugeleitet, die Leistung der Mikrowelle betrug $P_{\text{MW}} = 1 \text{ kW}$. Als Düse wurde eine wabenförmige Düse verwendet, wodurch die Plasmaflamme großflächiger, kürzer und homogener ausgestoßen wurde. So wurde eine homogene Behandlung einer möglichst großen Fläche gewährleistet. Das Kupfermaterial der Düse sorgt für eine Kühlung des austretenden Gasstroms. Die Zentrierung der Plasmaflamme erfolgte mit Hilfe eines Pappzylinders (Abbildung 3C). Dieser vermindert die Verwirbelung des Teilchenstroms durch die Umgebungsluft, wodurch möglichst viele Teilchen das Substrat erreichen können. Um die Temperatur der Substratoberfläche während der Plasmabehandlungen zu beobachten, wurde diese in regelmäßigen Abständen mit einem Infrarot-Thermometer (Voltcraft® IR 1200-50d, Conrad Electronic SE, Hirschau) gemessen.

Mit Myzel oder Konidien inokulierte Agarplatten wurden mittels doppelseitigen Klebebands an Metallplatten geklebt, welche an einem Stativ über der Flamme festgeschraubt werden konnten (Abbildung 3A). Für die Behandlung von Konidien auf PET-Folien wurden die Folien auf Metallplatten mit rechteckiger Aussparung befestigt um zu vermeiden, dass die Folie einen direkten Kontakt mit dem Metall hat. Zwetschgen und Erdbeeren wurden für die Plasmabehandlung mittels Unterdruck an einer Ansaugvorrichtung befestigt (Abbildung 3B). Der Unterdruck wurde hierfür mit Hilfe eines Luftverdichters erzeugt.

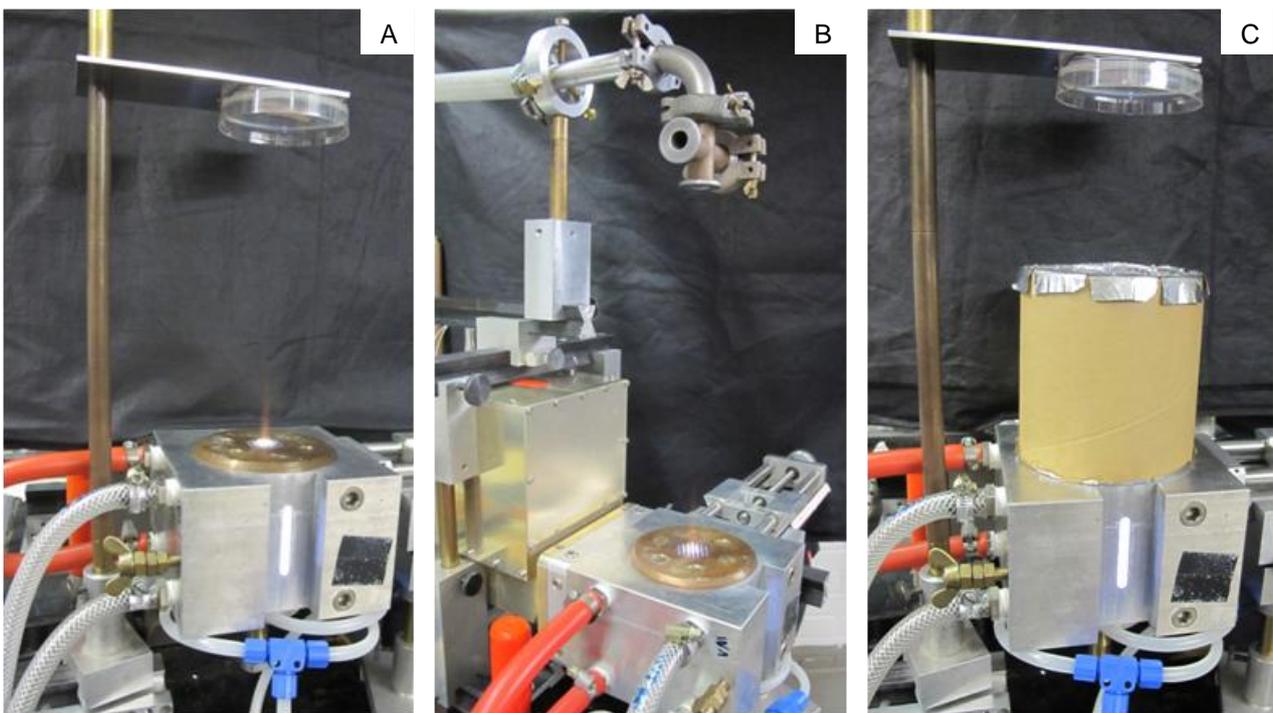


Abbildung 3. Vorrichtungen zur Plasmabehandlung.

Befestigung einer Agarplatte während einer Plasmabehandlung (A). Ansaugvorrichtung zur Befestigung einer Zwetschge über der Plasmaflamme (B). Ein Pappzylinder dient der Zentrierung von Plasma und Afterglow unter dem Substrat (C).

Durch die Gastemperatur des Plasmas konnte eine Erwärmung der Substrate nicht vollkommen verhindert werden. Der Agar auf den Platten konnte diesen Wärmeeintrag gut kompensieren und ableiten. PET-Folien sowie Zwetschgen und Erdbeeren, wurden jedoch im Laufe der Plasmabehandlung zu warm. Deshalb wurden Maßnahmen zur Kühlung ergriffen. Die PET-Folie wurde auf ihrer Rückseite mit einem Alkoholfilm versehen. Wasser hat sich hier als nicht ausreichend kühlend erwiesen. Für die Kühlung der Ansaugvorrichtung der Früchte wurde diese mit einem angefeuchteten Tuch umwickelt. Damit die Zwetschgen und Erdbeeren selbst nicht zu warm wurden, wurden gut gekühlte Früchte für die Versuche eingesetzt.

2.6 FRUCHTQUALITÄSANALYSEN

Um mögliche Auswirkungen der Plasmabehandlung auf die Qualität der Zwetschgen und Erdbeeren zu überprüfen, wurden ganze Früchte mit Plasma behandelt und anschließend die Qualitätsparameter überprüft. Bei Zwetschgen wurde Farbe, Festigkeit, Säure, Zucker, Vitamin C und der Gehalt an Polyphenolen überprüft. Von plasmabehandelten Erdbeeren wurden nach einem Boniturschema der Glanz der Fruchtoberfläche, der Zustand der Kronblätter, Beschädigungen und Fäulnis sowie Farbe, Festigkeit, Zucker und Säure analysiert. Die Früchte wurden jeweils 2,5 Minuten mit Plasma behandelt. Ein Teil der für die Qualitätsanalysen eingesetzten Fruchthälften wurde in kleinen Stücken in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -28 °C in Dunkelheit gelagert, um später für den Nachweis von Vitamin C und Polyphenolen verwendet zu werden. Zur Untersuchung der Qualitätsparameter bei Zwetschgen wurden je Variante 3 Wiederholungen mit jeweils mindestens 7 Früchten, also einem Minimum von insgesamt 21 verwendet. Von Erdbeeren wurden je Variante 3 x 20 Früchte verwendet. Nach der Plasmabehandlung wurden die Zwetschgen für einen Zeitraum von 5-8 Tagen, die Erdbeeren für 2 Tage gelagert, um auch verzögert auftretende mögliche Wirkungen der Plasmabehandlung erfassen zu können und die Lagerfähigkeit zu beobachten. Die Fruchtqualitätsanalyse erfolgte direkt nach der Ernte, bei Zwetschgen auch am Tag der Auslagerung (in der Regel einen Tag vor der Plasmabehandlung), sowie entsprechend nach der Plasmabehandlung.

Die Bestimmung der Grundfarbe der Früchte erfolgte mit Hilfe eines Chromameters (CR300, Konica Minolta Holdings Inc., Marunouchi, Japan). Die gemessene Farbe wird dabei mit drei Koordinaten beschrieben: Farbton, Helligkeit und Sättigung. L gibt die Helligkeit wieder, mit a und b werden Farbton und Sättigung angegeben. Des Weiteren kann die Farbe durch den h-Wert angegeben werden. Dieser stellt den sogenannten Bunttonwinkel dar, ein Maß für den Buntton der Fruchtschale beginnend mit 0° für Rot, über 90° für Gelb, zu 180° für Grün und 270° für Blau. Zur Verrechnung und Darstellung der Farbwerte wurde der h-Wert verwendet. Der h- Wert stellt den Winkel zur a-Achse dar.

Die Messungen der Fruchtfleischfestigkeit erfolgten bei Zwetschgen nach der Magnus Taylor Methode mit einem halbautomatischen Penetrometer (Fruit Texture Analyser, Güss Manufacturing (Pty.) Ltd., Strand, Südafrika). Dazu wurde ein Stempel mit einer Fläche von 1 cm² 5 mm tief ins Fruchtfleisch gedrückt. Die Ergebnisse werden in kg / cm² angegeben. Für die Bestimmung der Festigkeit von Erdbeeren wurde ein manuelles Härteprüfgerät mit einer Stempelgröße von 0,5 cm² verwendet (Typ HPEII Fff, Firma Heinrich Bareiss Prüfgerätebau GmbH, Oberdischingen). Auch hier erfolgte die Angabe der Festigkeit in kg / cm².

Der Gehalt an titrierbaren Säuren wurde mit einem vollautomatischen Titrierroboter (702 SM Titrino, Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt) bestimmt. Dafür wurden alle Früchte einer Wiederholung mit einem Haushaltsensafter (Design Juicer Advanced, Gastroback GmbH, Hollenstedt) entsaftet und anschließend durch Küchenpapier filtriert. 10 ml dieses Fruchtsaftes wurden dann mit 50 ml destilliertem Wasser versetzt. Der Gehalt an titrierbarer Säure wurde durch Titration auf pH 8,1 mit 0,1 N Natronlauge bestimmt. Das Ergebnis wurde in mval / 100 ml angegeben. Da immer alle Früchte einer Wiederholung entsaftet wurden, gibt es pro Wiederholung für die Säure nur einen Wert. Deshalb ist die Anzahl Replikate pro Sorte und Variante deutlich geringer als bei der Messung von Farbe und Festigkeit. Dasselbe gilt für die Bestimmung des Zuckergehaltes, da auch hierfür dieser Fruchtsaft verwendet wurde.

Für die Bestimmung der löslichen Trockensubstanz aus dem gewonnenen Fruchtsaft, welche näherungsweise den Zuckergehalt wiedergibt, wurde ein digitales Refraktometer der Firma Atago (PR 32 α , Atago Co. Ltd., Tokio, Japan) verwendet, das zuvor mit aqua dest. geeicht wurde. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in %.

Der Glanz der Fruchthaut, der Zustand der Kronblätter, der Grad an Beschädigung sowie das Auftreten von Fäulnis wurde bei den Erdbeeren anhand von Boniturskalen bestimmt (siehe Abbildung 4).

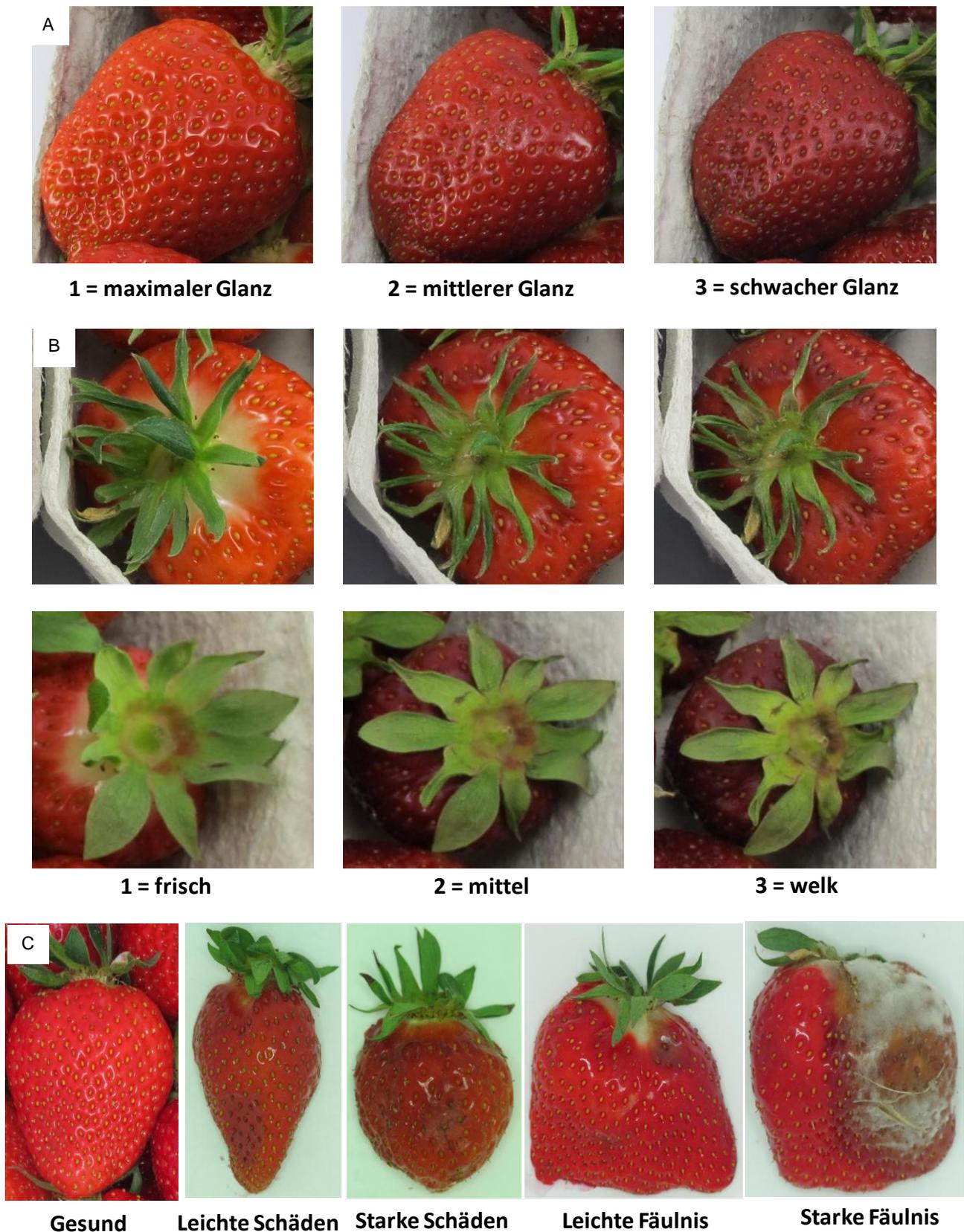


Abbildung 4. Boniturschemata Erdbeeren.

Reihe A zeigt die Abstufung bei der Bewertung des Glanz der Erdbeeroberfläche in Noten von 1-3. In den Reihen B ist die Abstufung der Frische der Kronblätter bei zwei verschiedenen Erdbeersorten mit schmalen und breiten Kronblättern dargestellt. Reihe C zeigt das Boniturschema zur Bewertung von Schäden und Fruchtfäulnis (Quelle: Neuwald, KOB).

2.7 BESTIMMUNG DES VITAMIN C -GEHALTS

Für die Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes wurden die Proben plasmabehandelter Zwetschgen bei allen beschriebenen Schritten vor Licht geschützt und gekühlt, um den Abbau des Vitamins zu verzögern. Die gefrorenen Proben wurden zunächst gemahlen und homogenisiert. Dazu wurden diese in einer gekühlten Kaffeemühle (Design KM basic, Gastroback GmbH, Hollenstedt) gemahlen und vom gewonnenen Fruchtpulver jeweils 8-10 g in Schnappdeckelgläser eingewogen. Nach Zugabe von 15 ml 3 % Metaphosphorsäure (HPO_3) wurden die Proben eine Minute mit einem Ultra Turrax Mixer (T25 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, 13.500 rpm) homogenisiert. Für die Vitamin C-Extraktion aus dem Fruchtgewebe wurden die homogenisierten Proben für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einer Ultrazentrifuge (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 15 Minuten bei 22.132 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reagenzglas überführt und etwa 0,5 ml davon mit einem Spritzenvorsatzfilter aus Nylon (0,45 µm, Perfect Flow®, Wicom International GmbH, Heppenheim) filtriert. Die filtrierten Extrakte wurden bis zur Analyse am nächsten Tag kühl und dunkel gelagert.

Das HPLC-System besteht aus zwei Pumpen (HPLC compact), einem UV / Vis-Detektor (Lambda 1010) und einem Säulentermostat (VarioTherm 4110). Alle Komponenten stammen von der Firma Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH. Für die Analyse wurden 20 µl des Filtrats manuell in die HPLC injiziert. Als Standard diente eine Lösung aus 10 mg Vitamin C und 200 ml 3 % HPO_3 (Verhältnis 1:20). Die Konzentration des Vitamin C in den Proben wurde über die Peakfläche des Chromatogramms berechnet (Neuwald und Streif, 2010). Die HPLC-Analyse der Proben wurden nach Veltman *et al.* (1999) mit den folgenden Parametern durchgeführt: Säule: ProntoSil 60-5-C18 (Bischoff, 5 µm, 125 × 4,0 mm), mobile Phase: 2,5 g Tetra Butyl Ammonium Hydrogen Sulfat und 55 ml Methanol in 1 L Milli-Q Wasser. Der isokratische Durchfluss betrug 0,8 ml / Min., der UV / Vis-Detektor wurde auf eine Wellenlänge von 254 nm eingestellt.

Die Peakfläche des Vitamin C wurde folgendermaßen berechnet: Zunächst wurde über die Einwaage an Frischgewicht die Konzentration der Probe pro 100 ml HPO_3 berechnet. Mit diesem Wert und der Peakfläche der jeweiligen Probe konnte dann die Fläche je 100 g Frischgewicht berechnet werden. Dann wurde die Peakfläche des Standards (10 mg / 200 ml) auf 100 g Frischgewicht des Fruchtgewebes umgerechnet. Das Verhältnis aus der Peakfläche der Probe und der Fläche des Standards ergibt dann den Gehalt an Vitamin C in mg / 100 g Frischgewicht.

Ebenso wie bei der Bestimmung der Qualitätsparameter Säure und Zucker wurden die einzelnen Früchte einer Wiederholung gemeinsam homogenisiert. Entsprechend ergab sich für den Vitamin C-Gehalt eine geringere Anzahl an Wiederholungen pro Versuch.

2.8 BESTIMMUNG DES POLYPHENOLGEHALTS

Zur Bestimmung des Polyphenolgehaltes plasmabehandelter Zwetschgen wurden tiefgefrorene Proben mittels HPLC am Lehrstuhl von Prof. Dr. Treutter am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München in Freising durchgeführt. Die im Folgenden beschriebene Methode ist in Treutter *et al.* (2012) publiziert.

Bei der Fruchtqualitätsanalyse tiefgefrorene Proben wurden zuvor für etwa eine Woche gefriergetrocknet (Pio-K-E-W, Dieter Piatkowski - Forschungsgeräte, München). In Freising wurde dieses Material dann mit einer Kugelmühle (Retsch GmbH, Haan) gemahlen (Schwingfrequenz: 60 Hz, 50 Sek.) und die Polyphenole aus 100 mg dieses gemahlene Materials in 0,8 ml einer Mischung aus Ameisensäure und Methanol (5:95, v/v) im eisgekühlten Ultraschallbad 30 Minuten extrahiert. Als interner Standard dienten 0,05 mg / ml Flavon. Das Lösungsmittel wurde durch Zentrifugation in einer Mikroliterzentrifuge (9.727 rcf, 10 Min.;

Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) und einer Vakuumzentrifuge (Univapo 150 H, UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg) vollständig entfernt. Bis zur Analyse wurden die so getrockneten Proben bei -20°C aufbewahrt. Dann wurden sie in Ameisensäure/Methanol (5:95, v/v) zu einer Konzentration von 1,25 g FG (Frischgewicht) / ml Lösungsmittel resuspendiert. 10 µl davon wurden in die HPLC injiziert.

Das HPLC-System besteht aus zwei Pumpen, einem automatischen Einspritzventil, und einem Diodenarraydetektor. Für die Derivatisierung und die Detektion von Katechinen und Proanthocyanidinen sind eine weitere analytische Pumpe und ein Detektor hintereinander geschaltet. Der Detektor ist auf eine Wellenlänge von 640 nm eingestellt. Phenolische Verbindungen wurden mittels einer Kinetex Pentafluorphenylsäule (2,6 µm, 150 × 4,6 mm) aufgetrennt und mit 5 % Ameisensäure sowie 95 % Methanol mit einer Rate von 0,5 ml / Min. eluiert.

Für die Berechnung der Peakflächen und die Quantifizierung der Phenole wurde die Software Geminix-III (Goebel Instrumentelle Analytik GmbH, Au in der Hallertau) verwendet. Für die Quantifizierung wurden die Phenole in drei Kategorien unterteilt und mit entsprechenden Wellenlängen dargestellt: 280 nm (unbekannte phenolische Verbindungen), 320 nm (Hydroxyzimtsäuren, Flavone, acylierte Flavonoide und Flavonole), 540 nm (Anthocyane). Für die Berechnung wurden spezifische Faktoren von Referenzverbindungen zugrunde gelegt. Unbekannte phenolische Verbindungen, Hydroxyzimtsäuren, acylierte Flavonoide und Flavonol wurden als Chlorogensäure, Flavone als Apigenin, Anthocyane als Cyanidin 3-Glykosid berechnet. Die Berechnung der Polyphenolkonzentration erfolgte nach Formel 1 über die spezifische Peakhöhe und Retentionsfaktoren (RF). In diesem Fall ist Chlorogensäure die Referenzverbindung, als Standard wurde Flavon verwendet. Konzentration Standard = 0,05 mg / ml, Verhältnis Phenol / kg TS (Trockensubstanz) = 8. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in mg / kg TS.

$$\frac{\text{Peak Probe}}{\text{Peak Standard}} \times \frac{\text{RF Chlorogensäure}}{\text{RF Standard}} \times 8 \times 0,05 = \text{Polyphenolkonzentration} \quad \text{Formel 1}$$

Durch die Zusammenführung und Homogenisierung der einzelnen Früchte einer Wiederholung für die Herstellung des Extraktes ist die Anzahl Wiederholungen pro unabhängigen Versuch geringer als bei der Bestimmung von Festigkeit und Farbe.

2.9 CHARAKTERISIERUNG DES PLASMAS

Um die Wirkmechanismen des Atmosphärendruck Plasmas genauer charakterisieren zu können, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, in denen während der Plasmabehandlung von Myzelsuspension von *M. laxa* MgF₂ Plättchen (Magnesiumfluorid, Korth Kristalle GmbH, Altenholz) als optische Filter eingesetzt wurden. Dazu wurde das Plättchen während der Plasmabehandlung mit wärmebeständigem Klebeband auf inokulierten PDA Platten (ø 60 mm) befestigt. Dadurch wurde das Substrat vor den Plasma-Radikalen abgeschirmt. Abbildung 5 zeigt die Transmissionscharakteristika von MgF₂ bei einer Materialstärke von 2 mm. Es ist für 60-95 % der UV-Strahlung durchlässig, wobei die Plasmaradikale bei dieser Methode mechanisch zurückgehalten werden und die Substratoberfläche nicht erreichen.

Behandelt wurden ausplattierte Myzelsuspensionen wie in Kapitel 2.3 beschrieben. Die Auswertung der Varianten unbehandelte Kontrolle, UV-behandelt und plasmabehandelt erfolgte durch Zählen der K_bE.

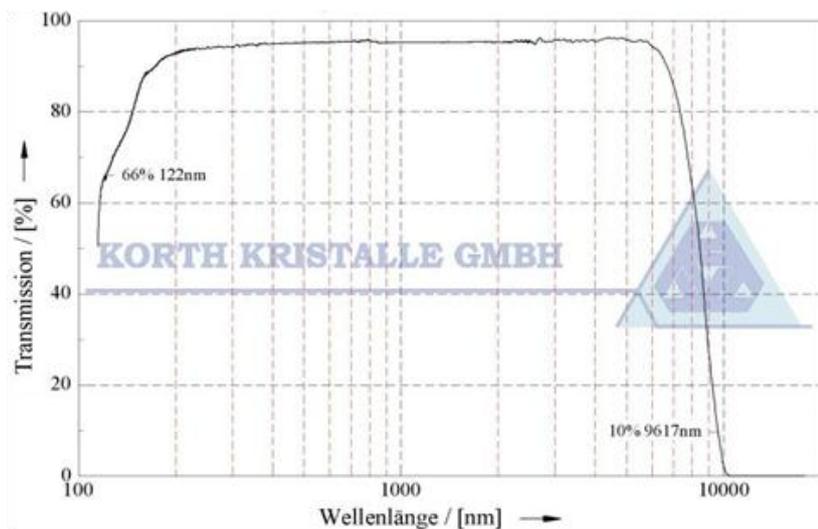


Abbildung 5. Transmissionspektrum von MgF₂.

Materialstärke 2 mm. Das Material ist für 60-95 % der UV-Strahlung im Bereich zwischen 100 und 600 nm durchlässig (UV-Spektrum 100 nm - 380 nm). Bildquelle: Korth Kristalle GmbH, Altenholz (<http://www.korth.de/index.php/material-detailansicht/items/21.html>).

2.10 AUSWERTUNG DER DATEN UND STATISTIK

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 21 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen). Als Quelle wurde das SPSS Handbuch Statistik mit SPSS für Windows Version 15 (Diehl und Staufenbiel, 2007) verwendet. Die im Folgenden geschilderten Vorgehensweisen sind, soweit nicht abweichend gekennzeichnet, daraus entnommen. Für die statistische Auswertung der Daten wurden, je nach Anzahl der zu vergleichenden Varianten, univariate Varianzanalysen oder T-Tests durchgeführt. Statistische Analyseergebnisse werden im Folgenden mittels einer buchstabenbasierten Darstellung verdeutlicht. Dabei werden statistisch nicht signifikante Varianten mit denselben Buchstaben gekennzeichnet.

2.10.1 UNIVARIATE VARIANZANALYSE

Eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) wurde durchgeführt, wenn mehr als 2 Varianten miteinander verglichen werden sollten. Der p-Wert wurde dabei immer auf 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit = 5 %) festgelegt. Zunächst wurden hierfür die Daten auf ihre Eignung für eine Varianzanalyse, Normalverteilung und Varianzhomogenität, getestet. Der Test auf Normalverteilung der Daten wurde nach Kolmogorov-Smirnov (Massey, 1951; beinhaltet eine Signifikanzkorrektur nach Lilliefors (Lilliefors, 1967)) durchgeführt. Da dieser Test jedoch konservativ ist und die Normalverteilung vor allem bei großen Stichproben zu häufig ablehnt, wurde die Normalverteilung zusätzlich über Q-Q-Diagramme überprüft (Webinger *et al.*, 2014). Lagen die Punkte in diesen Diagrammen nahe an der diagonalen Geraden, wurde von einer näherungsweise Normalverteilung der Daten ausgegangen (Diehl und Staufenbiel, 2007). Mit dem Test nach Levene (1960) wurden die Daten zudem auf Varianzhomogenität getestet. War dieser Test signifikant, konnte also nicht von Varianzhomogenität ausgegangen werden, wurden die Mittelwerte zusätzlich zur ANOVA nach einem von Welch (1938) entwickelten Verfahren auf Gleichheit geprüft. Bei signifikanten Unterschieden wurden dann multiple Mittelwertvergleiche nach Games und Howell (1976) durchgeführt. Konnte nach dem Levene-Test von Varianzhomogenität ausgegangen werden, wurde eine ANOVA mit anschließendem post-hoc Test nach Tukey (honestly significant difference, HSD; Jaccard *et al.*, 1984) durchgeführt (gleicher Stichprobenumfang). Bei ungleichem Stichprobenumfang wurden die Mittelwerte mit einem multiplen T-Test mit Bonferroni-Korrektur (least significant difference, LSD-Bonferroni) verglichen (Diehl und Staufenbiel, 2007).

2.10.2 T-TEST

Für den Vergleich zweier unabhängiger Mittelwerte wurden T-Tests durchgeführt. Auch hier wurden die Daten zunächst auf die Voraussetzungen Varianzhomogenität und Normalverteilung überprüft. Wurden für die Varianz signifikante Unterschiede angegeben ($p > 0,05$), wurde eine Anpassung an den T-Test, der Welch-Test, verwendet (Diehl und Staufenbiel, 2007).

3 Ergebnisse

Zielsetzung des Projekts war die Überprüfung einer grundsätzlichen Eignung einer Plasmabehandlung als Nacherntemethode gegen die Fruchtfäuleerreger *Monilia spp.* auf Zwetschge und *Botrytis cinerea* auf Erdbeere. Hierfür wurden Sporen und Myzel der Ascomyceten zunächst auf Modellsubstraten mit Plasma behandelt um eine prinzipielle Wirkung zu zeigen und eine minimal notwendige Behandlungsdauer zu ermitteln. Für die Gewährleistung der Produktsicherheit nach einer Plasmabehandlung wurde zudem ein breites Spektrum an Fruchtqualitätsparametern plasmabehandelter Früchte bestimmt. Zusätzlich wurden Versuche zum Nachweis der synergistischen Wirkung der Plasmaparameter durchgeführt. Um eine mögliche Umsetzung in die Praxis zu überprüfen, wurden inokulierte Zwetschgen mit Plasma behandelt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Analysen und ihre statistische Auswertung dargestellt.

3.1 TEMPERATURÜBERWACHUNG

Da die Plasmabehandlung mit der für die Versuche eingesetzten Plasmaquelle zu einer Erwärmung der Substrate führt, wurde die Temperatur der Substratoberfläche während der Plasmabehandlungen ständig überwacht, um ein übermäßiges Erhitzen auszuschließen. Hierfür wurde die Temperatur in regelmäßigen Abständen mit einem Infrarot-Thermometer (Voltcraft® IR 1200-50d, Conrad Electronic SE, Hirschau) gemessen. Abbildung 6A zeigt den Verlauf der Temperatur der Oberfläche einer Agarplatte während einer Plasmabehandlung von 10 Minuten. Der Agar erreicht dabei eine Maximaltemperatur von 38,3 °C. Abbildung 6B zeigt den Temperaturverlauf einer mit 70 %igem Alkohol gekühlten PET-Folie während 10 Minuten Plasmabehandlung. Bis der Alkohol nach etwa 9 Minuten verdampft ist, bleibt die Temperatur der Folie bei maximal 36,2 °C. Danach steigt sie sprunghaft auf 76,3 °C an. Eine PET-Folie kann demnach für eine beliebige Dauer der Plasmabehandlung mit Alkohol gekühlt werden, sofern dieser zwischendurch immer wieder nachgefüllt wird, um den verdampften Anteil zu ersetzen. Eine Agarplatte zeigt durch ihren Wassergehalt demnach eine grundsätzlich bessere Wärmekompensation und dadurch eine deutlich langsamere Erwärmung. Beide Substrate zeigen einen sprunghaften Anstieg der Oberflächentemperatur von etwa 23 °C auf etwa 32 °C in den ersten 30 Sekunden der Plasmabehandlung. In der folgenden Zeit zeigt der Temperaturverlauf einen deutlich verlangsamten Anstieg bis zum jeweiligen Maximum.

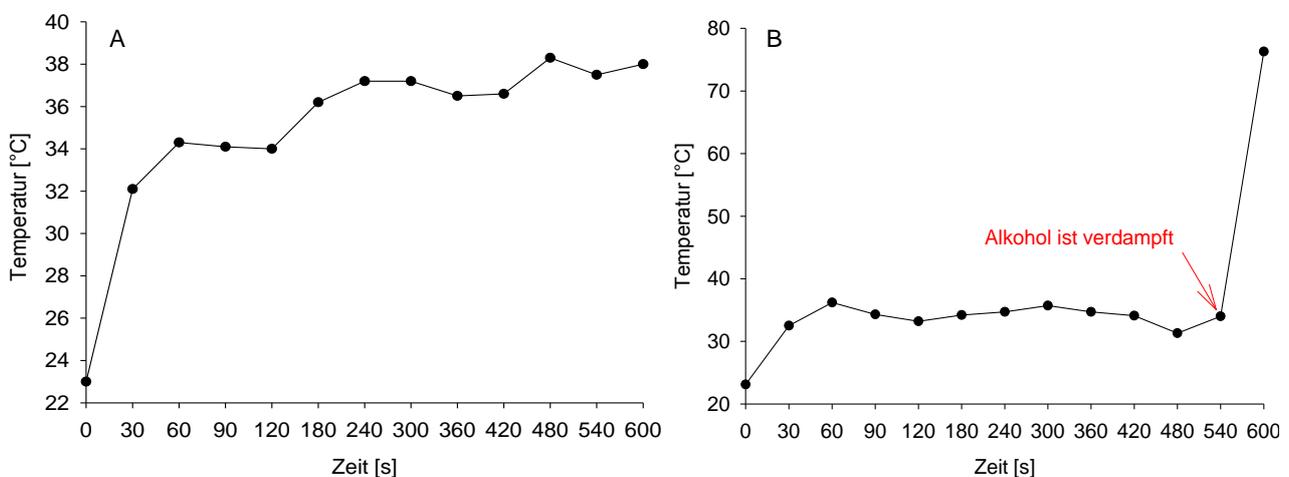


Abbildung 6. Messung der Oberflächentemperatur verwendeter Modellsubstrate.

A: Temperaturverlauf einer PDA-Platte. Die Temperatur erreicht ein Maximum von 38,3 °C. B: Verlauf der Temperatur einer PET-Folie mit Kühlung durch Alkohol. Der Zeitpunkt der Alkoholverdampfung ist mit einem roten Pfeil markiert.

3.2 WÄRMEEFFEKT

Da die Substrate während der Plasmabehandlung erwärmt werden, sollte ausgeschlossen werden, dass die Abtötung von Myzel und Konidien auf einem Hitzeeffekt beruht. Um zu zeigen, dass es sich bei der Abtötung von Myzel durch die Plasmabehandlung tatsächlich um einen Effekt des Plasmas und nicht um eine Abtötung durch Hitze handelt, wurden Kulturen von *M. laxa* entsprechend der maximalen Dauer einer Plasmabehandlung für jeweils 10 Minuten in einem Brutschrank Temperaturen von 20, 30, 40 und 50 °C ausgesetzt. Hierfür wurden zuvor 20 µl einer Myzelsuspension auf kleine PDA Platten (ø 60 mm) aufgetropft, beziehungsweise ausplattiert und nach der Wärmebehandlung inkubiert (23 °C, 14 h Licht). Die Auswertung erfolgte nach 2-3 Tagen durch Messung des Myzeldurchmessers oder durch Zählung der KbE. In Abbildung 7A ist der mittlere Myzeldurchmesser der Kulturen nach der jeweiligen Temperaturbehandlung dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten hat ergeben, dass die verschiedenen Temperaturen keine signifikanten Unterschiede im Myzelwachstum bewirkt haben. In der Abbildung 7B ist die mittlere Anzahl KbE dargestellt. Auch hier ergab die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine bis zu 10-minütige Plasmabehandlung von Myzel auf Agarplatten möglich ist, ohne den Plasmaeffekt durch eine mögliche Hitzewirkung zu beeinflussen. Die verhältnismäßig größere Standardabweichung bei der Anzahl der KbE ergibt sich aus Schwankungen in der Konidienzahl bei der Ausbringung der verschiedenen Versuchswiederholungen.

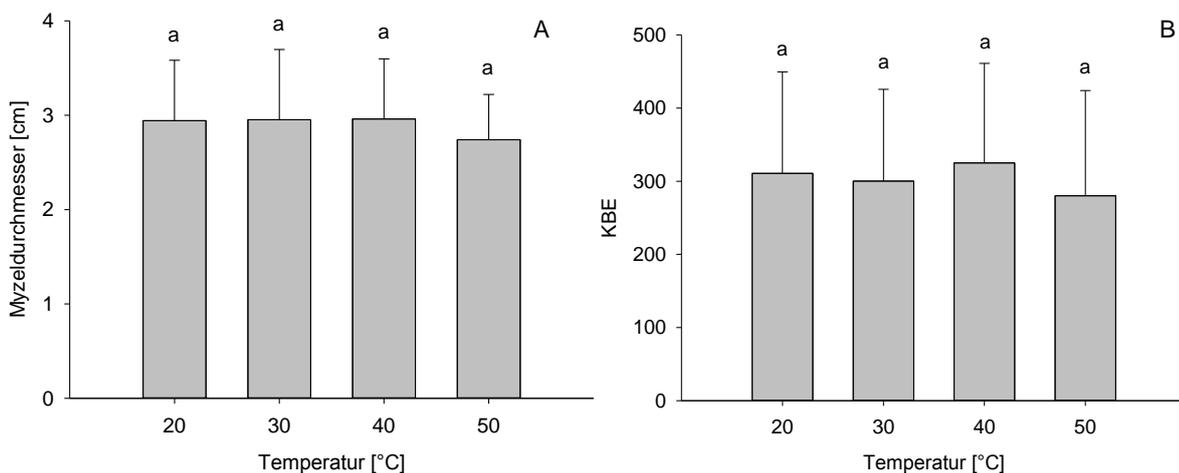


Abbildung 7. Überprüfung eines möglichen Wärmeeffektes auf *M. laxa*.

A: Myzeldurchmesser (n = 18). Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen. B: KbE (n = 12), Einzelwerte aus 2 unabhängigen Versuchswiederholungen.

3.3 BEHANDLUNG VON *M. LAXA* SPOREN AUF PET-FOLIE

Als alternatives Modellsubstrat wurde die Eignung einer PET Folie überprüft. In einigen Publikationen wird eine PET Folie als Modellsubstrat für Pilzsporen verwendet, weshalb diese Methode als geeignet erschien, unter Umständen als Alternative zu Agarplatten verwendet werden zu können (Feichtinger *et al.*, 2003; Muranyi, 2008). Da die Sporen auf einer Folie trocken vorliegen und nicht wie auf Agarplatten in das Substrat einsinken oder vorzeitig keimen können, besteht die Möglichkeit, dass PET Folien für Sporen besser geeignete Modellsubstrate darstellen.

Um die Sporen (*M. laxa*) auf die Folien aufzubringen, wurde eine Airbrushpistole verwendet. Eine Metallschablone gewährleistete dabei eine genaue Applikation der Sporen auf eine definierte Fläche der Folie (Abbildung 8A). Nach der Plasmabehandlung wurden die Sporen mit Ringerlösung (+Tween) durch Schütteln in einem sterilen Flüssigprobenbeutel von der Folie abgelöst. Durch Ausplattieren der so gewonnenen Sporensuspension auf PDA konnten nach 2-3 Tagen Inkubation KbE gezählt werden. In Abbildung 8B ist die Verteilung der Sporen auf der Folie zu sehen. Die Sporen liegen gleichmäßig verteilt und einzeln auf der

Folie vor, was für eine zuverlässige Wirksamkeit des Plasmas ohne Abschirmeffekte von Bedeutung ist. In Abbildung 11C sind die KbE auf einer PDA-Platte zu erkennen. Aus den vereinzelt vorliegenden Sporen wachsen kleine Kolonien welche sich gut zählen lassen und die Versuchsvarianten so vergleichbar machen.

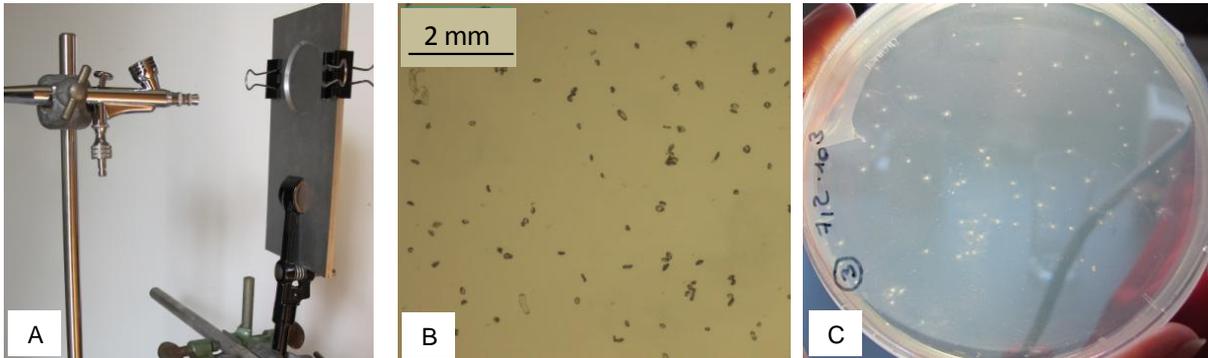


Abbildung 8. Applikationstechnik und Resultat einer Sporensuspension auf PET-Folie.

Aufbau der Applikationstechnik mit Airbrushpistole und Metallschablone (A). Lichtmikroskopische Aufnahme der Sporenverteilung auf einer PET-Folie, 10 x Vergrößerung, Maßstab 2 mm (B). KbE aus Sporen auf einer PDA-Platte (C).

3.4 VORVERSUCH ZUR PLASMABEHANDLUNG VON MYZEL

In Vorversuchen wurde der Effekt der Plasmawirkung auf Myzelsuspensionen von *M. laxa* untersucht, indem der Durchmesser der aus einem Suspensionstropfen gewachsenen Kultur gemessen und mit unbehandelten Kontrollen verglichen wurde. Diese Methode hat sich als unkompliziert und schnell erwiesen, um einen ersten Eindruck zur Plasmawirkung zu bekommen. Dazu wurde aus einer *M. laxa* Flüssigkultur wie zuvor beschrieben eine Myzelsuspension hergestellt und davon 20 µl auf eine PDA-Platte aufgetropft. Nach dem Trocknen wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag 5 Minuten mit Plasma behandelt. Die Kontrollplatten blieben dabei unbehandelt. Nach der Plasmabehandlung wurden die Platten im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung des Durchmessers des aus dem Tropfen gewachsenen Myzels mit einem herkömmlichen Lineal. Die verschiedenen Verdünnungen der Myzelsuspension wurden verwendet, um einen möglichen Effekt der Inokulumdichte auf die Plasmawirkung zu untersuchen. Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, ergab sich bei allen drei Verdünnungsstufen der Myzelsuspension nach der Plasmabehandlung ein signifikant kleinerer Myzeldurchmesser im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

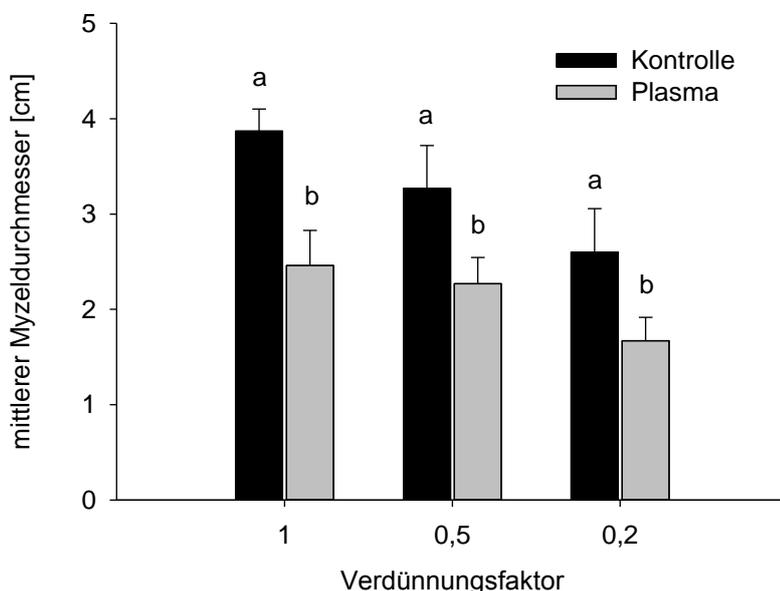


Abbildung 9. Vorversuch zur Plasmabehandlung von Myzelsuspension auf PDA.

Messung des Myzeldurchmessers und Vergleich mit dem Wachstum der unbehandelten Kontrolle. Verwendet wurden verschiedene Verdünnungen der Myzelsuspension (1:1, 1:2 und 1:5). Dargestellt sind n = 10 Einzelwerte aus einem Vorversuch.

Anhand dieser Ergebnisse konnte nun von einer grundsätzlichen Wirksamkeit des Plasmas auf das Wachstum von Hyphen ausgegangen werden. Die Reduktion durch die Plasmabehandlung unterscheidet sich zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen nicht wesentlich. So liegen zwischen den Varianten Kontrolle und Plasma 1,13 cm (1:1, unverdünnt), 0,87 cm (1:2) und 0,90 cm (1:5) Unterschied. Anhand dieser Zahlen ist keine verringerte Plasmawirkung durch eine erhöhte Myzeldichte auf dem Substrat nachzuweisen.

3.5 VORVERSUCHE ZUR PLASMABEHANDLUNG VON KONIDIEN

In vier Vorversuchen wurde die allgemeine Wirkung einer 5-minütigen Plasmabehandlung auf Sporen von *M. laxa* untersucht. Eine Sporensuspension wurde wie in Kapitel 2.7 beschrieben hergestellt. Um ein vorzeitiges Keimen der Sporen zu verhindern, wurde diese über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und erst vor Ort am IGVP wurden die Agarplatten (Ø 94 mm) durch Ausplattieren von jeweils 100 µl Sporensuspension inokuliert. Dabei wurde darauf geachtet, die Suspension sorgfältig zu verteilen, sodass die Agaroberfläche sofort wieder trocknete. Direkt im Anschluss wurden die Platten dann für 5 Minuten mit Plasma behandelt, wobei die Kontrollen unbehandelt blieben. Nach drei Tagen Inkubation wurde die Plasmawirkung durch Ermittlung der KbE pro Platte überprüft. In Abbildung 10 ist die mittlere Anzahl KbE der beiden untersuchten Varianten, unbehandelte Variante und 5 Minuten Behandlungsdauer, im Boxplot dargestellt.

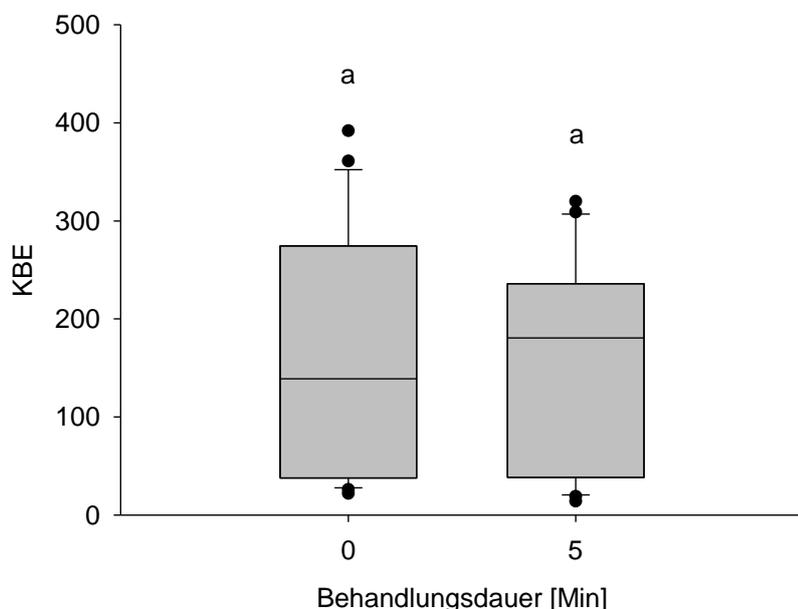


Abbildung 10. Plasmabehandlung von Konidien, Vorversuch.

5 Minuten Behandlungsdauer (n = 24) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n = 22). Dargestellt sind Einzelwerte aus 4 unabhängigen Versuchswiederholungen.

Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede in der Sporenceimung zwischen den plasmabehandelten und den unbehandelten Varianten. Anhand dieser Ergebnisse wurden weitere Versuche geplant, wobei davon ausgegangen wurde, dass eine Plasmabehandlung von 5 Minuten für eine Abtötung von Konidien nicht ausreichend ist.

3.6 KÜNSTLICHE INOKULATION VON ZWETSCHGEN

Um eine erfolgreiche Inokulation von Zwetschgen mit *Monilia laxa* zu erreichen, wurden verschiedene Ansätze getestet. Es wurde sowohl Myzel- als auch Sporensuspension verwendet. Die Früchte wurden mit intakter Fruchthaut inokuliert oder die Fruchthaut durch Aufrauen mit Sandpapier verletzt. Zudem wurde überprüft, ob eine Vorkonditionierung der Sporen in Zuckerlösung die Infektionsbedingungen verbessert.

Wie in Abbildung 11 bei einigen mit einem roten Kreis markierten Früchten zu erkennen ist, führte die Inokulation intakter Früchte mit einer Myzelsuspension zu keiner Infektion. Das Myzel zeigte sehr langsames Wachstum kaum über die Tropfengröße des Inokulums hinaus, das nur auf der Oberfläche der Frucht stattfand. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Sporensuspension auf intakter Fruchthaut erzielt (Abbildung 12). Das

oberflächliche Myzelwachstum war auch hier, jedoch deutlich schwächer als bei mir Myzelsuspension inokulierten Früchten erkennbar. Dabei zeigten sich keine Unterschiede im Infektionserfolg zwischen in Zuckerlösung vorkonditionierten und in Ringerlösung suspendierten Sporen.

Zur Verdeutlichung der mit einem roten Kreis markierten Symptome sind Detailaufnahmen des oberflächlichen Myzelwachstums auf mit Sporensuspension inokulierten Zwetschgen in Abbildung 13 vergrößert dargestellt.

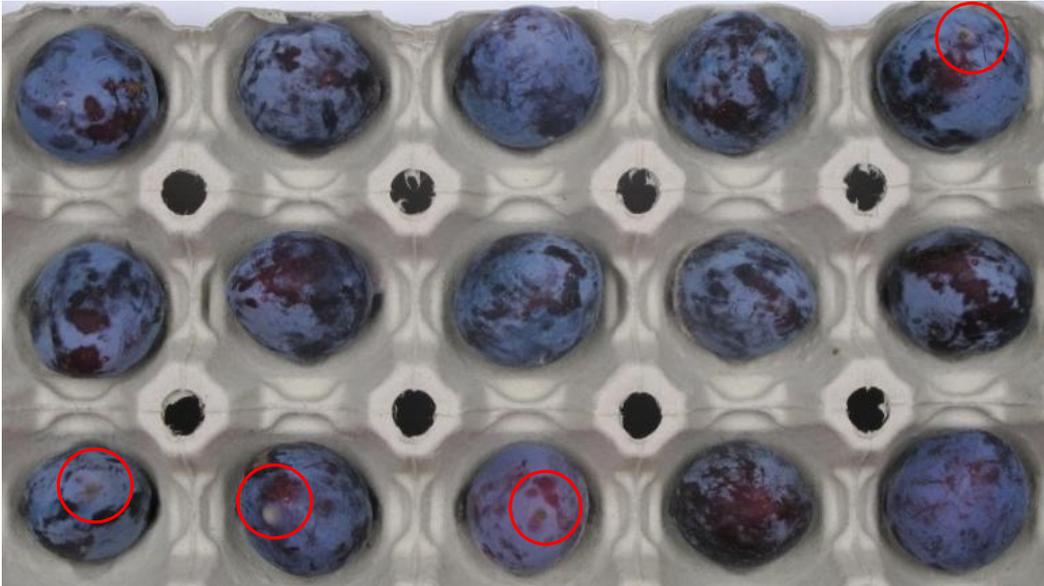


Abbildung 11: Inokulation intakter Früchte mit Myzelsuspension.

Nicht alle Früchte zeigen Symptome. Oberflächliches Myzelwachstum ist mit einem roten Kreis markiert.



Abbildung 12. Inokulation intakter Früchte mit Sporensuspension.

Nicht inokulierte Kontrollfrüchte (obere Reihe), Sporensuspension in Zuckerlösung vorkonditioniert (mittlere Reihe), Sporensuspension in herkömmlicher Ringerlösung (untere Reihe). Oberflächliches Myzelwachstum ist mit einem roten Kreis markiert.

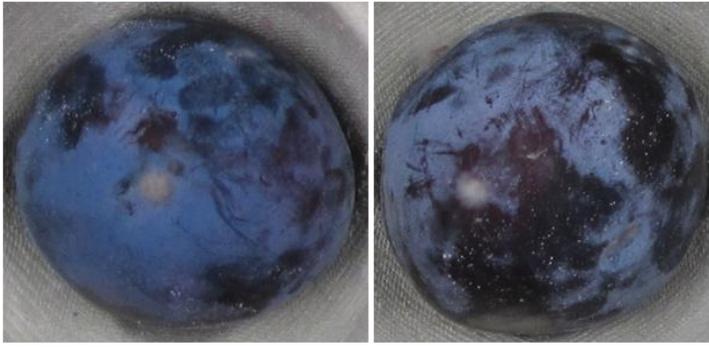


Abbildung 13. Vergrößerter Ausschnitt zweier mit Sporensuspension inokulierter Früchte. Symptome dieser Art sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 mit einem roten Kreis markiert.

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen, dass die Inokulation mit Sandpapier verletzter Früchte zu besseren Ergebnissen führte. Dabei zeigt Abbildung 14 den Vergleich zwischen Myzelsuspension und Sporensuspension als Inokulum. Abbildung 15 zeigt in Zuckerlösung vorinkubierte Sporensuspension im Vergleich zu Sporensuspension in Ringerlösung. Sowohl mit Myzelsuspension als auch mit Sporensuspension wurde eine Infektion erreicht, jedoch ist erkennbar, dass mit Sporen ein deutlich besseres und einheitlicheres Infektionsergebnis erzielt werden konnte als mit Myzelsuspension. Beim Vergleich vorinkubierter Sporen mit Sporen in Ringerlösung, konnte erneut kein Unterschied im Infektionserfolg beobachtet werden.

Die besten Infektionsergebnisse wurden demnach mit Sporensuspensionen auf mehrfach angerauten Fruchtoberflächen erzielt, eine Vorinkubation der Sporen in Zuckerlösung zeigt keine Verbesserung der Infektionsbedingungen.



Abbildung 14. Inokulierte Zwetschgen, Vergleich von Myzelsuspension und Sporensuspension.

Untere Reihe: mit Myzelsuspension inokulierte Früchte im Vergleich zu mit Sporensuspension inokulierten Früchten (mittlere Reihe) und nicht inokulierten Kontrollfrüchten (obere Reihe).



Abbildung 15. Inokulierte Zwetschgen, Vergleich zweier Sporensuspensionen.

Verwendet wurden in Zuckerlösung vorinkubierte Sporen (mittlere Reihe) im Vergleich zu Früchten mit Sporen in herkömmlicher Ringerlösung (untere Reihe) und nicht inokulierten Kontrollfrüchten (obere Reihe).

3.7 PLASMABEHANDLUNG VON MYZEL VON *MONILIA LAXA*

Nach den vielversprechenden Ergebnissen durch eine 5-minütige Plasmabehandlung von Myzelsuspensionen (Kapitel 3.4), sollte der genaue Verlauf der Kinetik einer Plasmabehandlung näher untersucht werden. Hierzu wurden die Myzelsuspensionen auf PDA-Platten unterschiedlich lange dem Plasma ausgesetzt: 0; 2,5; 5; 7,5 sowie 10 Minuten, wobei 0 Minuten die unbehandelte Kontrolle darstellte. Ziel dieser Versuchsreihe war es, eine minimale Behandlungsdauer zu bestimmen, bei der eine maximale Abtötungsrate der Hyphen auf der Platte erreicht werden kann. Bewertet wurde die jeweilige Wirkung auf das Wachstum der Hyphen durch zählen der KbE und den Vergleich der jeweiligen Variante mit den unbehandelten Kontrollen.

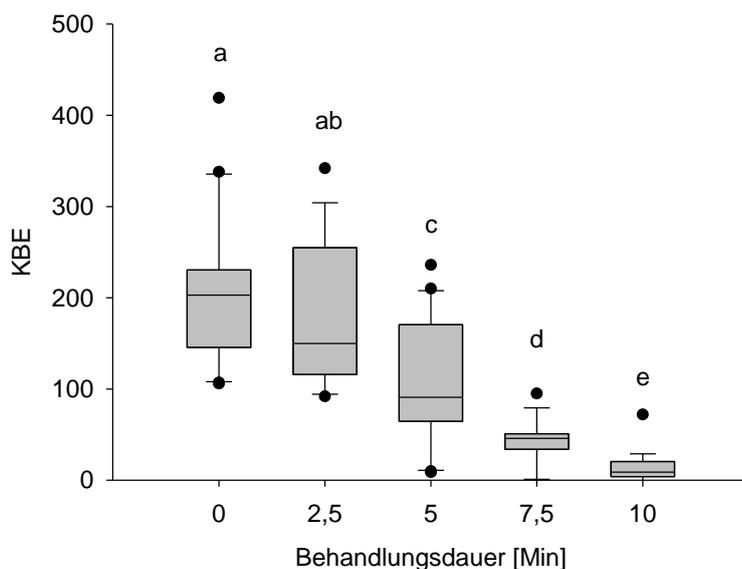


Abbildung 16. Plasmabehandlung von *M. laxa* Myzel, Zeitreihe, Darstellung im Boxplot.

Mit 0 (n = 21); 2,5 (n = 15); 5 (n = 21); 7,5 (n = 15) und 10 (n = 21) Minuten Behandlungsdauer. Dargestellt sind Einzelwerte aus 6 unabhängigen Versuchswiederholungen.

Abbildung 16 zeigt den Einfluss der verschiedenen Behandlungszeiten auf das Wachstum der Hyphen und die daraus resultierende Bildung von KbE als Boxplot. Diese Darstellung verdeutlicht, dass die Streuung der einzelnen Werte innerhalb einer Variante relativ groß ist. Dies begründet sich auf der je Versuch unter-

schiedlichen Ausgangskeimzahl auf den Platten. Über die Messung der optischen Dichte der für den jeweiligen Versuch eingesetzten Myzelsuspension konnte zwar immer ein in etwa gleicher Wert eingestellt werden, die Praxis zeigte jedoch, dass dieser Wert lediglich zu einem gewissen Grad mit der Anzahl Hyphen in der Suspension korreliert. Vermutlich wird die gemessene optische Dichte nicht nur durch die Hyphen in der Suspension, sondern auch von der Färbung des Myzels durch eingelagertes Melanin beeinflusst. Die Erfahrung hat gezeigt, dass die Braunfärbung des Myzels und damit die der Myzelsuspension immer etwas variiert. Trotz der unterschiedlichen Ausgangszahl an Hyphen auf den Agarplatten war der Kurvenverlauf der einzelnen Versuchswiederholungen jedoch stets vergleichbar. Mit einer Varianzanalyse konnte, verglichen mit der Kontrolle (Median = 203 KbE), nach 5 Minuten Behandlungsdauer (Median = 91 KbE) ein signifikanter Effekt festgestellt werden. In der Folge bewirkte das Plasma ebenfalls signifikante Abtötungsraten im Vergleich zur jeweils vorherigen Behandlungszeit: Der Median liegt nach 7,5 Minuten bei 46 KbE, nach 10 Minuten bei 9 KbE. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Behandlungszeit von 2,5 Minuten (Median = 150 KbE). Nach 10 Minuten Plasmabehandlung ergab sich eine durchschnittliche Abtötungsrate von 92,22 %.

Zur Verdeutlichung der Abtötungsraten sind diese in Tabelle 1 gesondert dargestellt. Innerhalb der einzelnen Versuchswiederholungen sind diese relativ konstant. Die größte Standardabweichung zeigt sich bei 5 Minuten Behandlungszeit. Hier wurde sowohl eine Rate von 92,86 % als auch eine vergleichsweise sehr viel geringere Rate von 22,15 % erreicht. Eine verlässliche Aussage zur Abtötungsrate bei 5 Minuten Behandlungsdauer ist demnach anhand dieser Daten nicht möglich. Auch die Wiederholungen der 7,5 Minuten Behandlungsdauer zeigen eine relativ variable Abtötungsrate mit Werten zwischen 60,31 % und 98,74 %. 10 Minuten Plasmabehandlung scheinen ausreichend lang zu sein, um eine konstant zuverlässige Wirkung zu erreichen. Die Werte liegen hier zwischen 88,92 % und 100,00 %, was einer Standardabweichung von 5,59 % entspricht.

Tabelle 1. Mittlere Abtötungsrate von Myzel.

Prozentual zur unbehandelten Kontrolle (0 Min.) für 6 unabhängige Versuchswiederholungen (n = 15, bzw. 21) sowie Mittelwert und Standardabweichung der dargestellten Werte.

Behandlungsdauer [Min]	mittlere Abtötung [%]							MW	Stdabw.
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	N/A	3,15	12,41	18,49	13,46	6,46	10,79	6,04	
5,0	56,69	92,86	36,67	55,01	37,31	22,15	50,12	24,58	
7,5	N/A	98,74	83,94	72,38	76,66	60,31	78,41	14,24	
10,0	96,83	100,00	93,05	84,63	89,91	88,92	92,22	5,59	

In Abbildung 17 ist die Zeitreihe der Abtötung von Myzel zusätzlich zur Boxplot-Darstellung in Abbildung 16 als Kurve dargestellt. Diese Darstellung soll verdeutlichen, dass die Abtötung der Hyphen in drei Phasen verläuft. Zwischen 0 Minuten und 2,5 Minuten verläuft die Kurve recht flach, zwischen 2,5 Minuten und 7,5 Minuten verläuft sie deutlich steiler um dann zwischen 7,5 Minuten und 10 Minuten wieder etwas flacher zu werden. Dieser sigmoidale Kurvenverlauf war auch in den einzelnen Versuchen jeweils deutlich erkennbar.

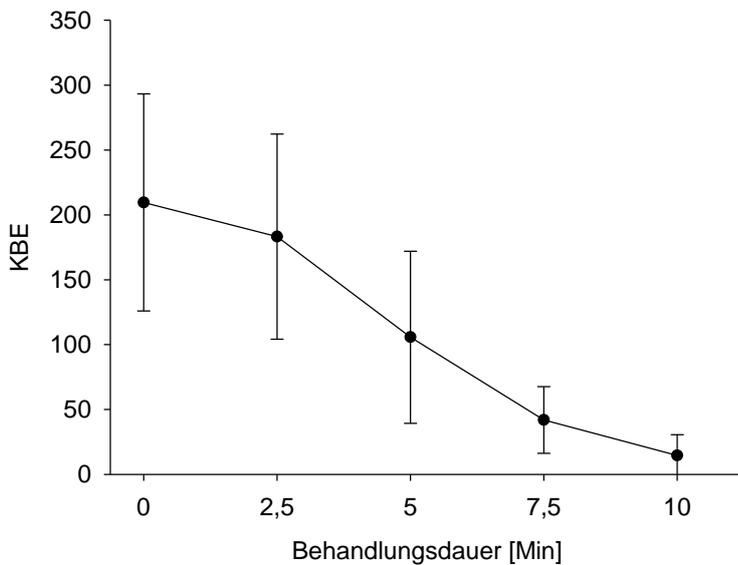


Abbildung 17. Plasmabehandlung von *M. laxa* Myzel, Zeitreihe.

Mit 0 (n = 21); 2,5 (n = 15); 5 (n = 21); 7,5 (n = 15) und 10 (n = 21) Minuten Behandlungsdauer. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchswiederholungen dargestellt.

3.8 PLASMABEHANDLUNG VON KONIDIEN VON *MONILIA LAXA*

Nachdem eine 5-minütige Plasmabehandlung keinen Effekt gezeigt hat (siehe Kapitel 3.5), wurde ebenso wie für Myzel, eine zeitabhängige Wirkung des Plasmas ermittelt. Das Ziel war auch hier, eine maximale Störung der Konidienkeimung mit minimaler Behandlungsdauer zu bestimmen. Auch hier erwies es sich als schwierig, eine konstante Ausgangskeimzahl für die verschiedenen Versuchswiederholungen zu erreichen. Die Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 18 zeigt deshalb eine recht große Streuung der Einzelwerte um den Median. Dennoch waren auch hier die Ergebnisse der einzelnen Versuchswiederholungen in ihrem Verlauf vergleichbar. Durch Varianzanalyse der Daten konnte gezeigt werden, dass zwischen den einzelnen Mittelwerten keine signifikanten Unterschiede bestehen. Demnach hat die Plasmabehandlung auch nach 10 Minuten Behandlungsdauer keinen hemmenden Einfluss auf die Keimung der Sporen und die Ergebnisse aus den Vorversuchen wurden hiermit bestätigt.

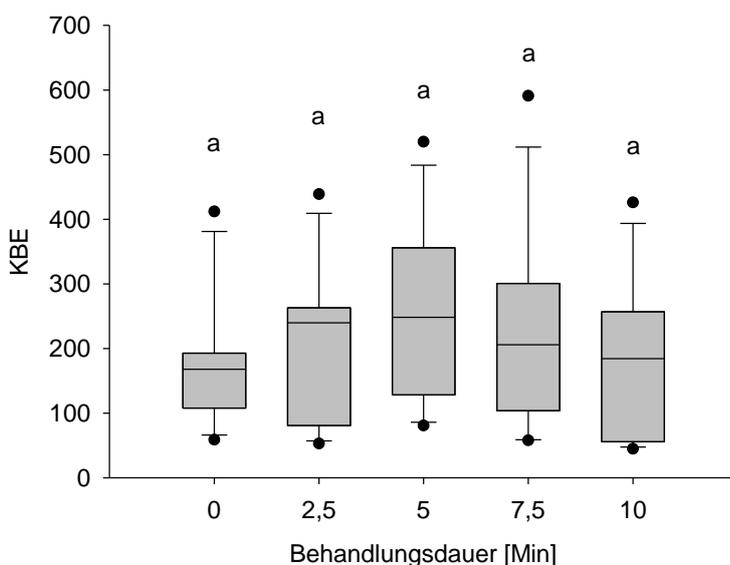


Abbildung 18. Plasmabehandlung von *M. laxa* Konidien, Zeitreihe, Darstellung im Boxplot.

Mit 0 (n = 11); 2,5 (n = 11); 5 (n = 12); 7,5 (n = 12) und 10 (n = 12) Minuten Behandlungsdauer. Dargestellt sind Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen.

3.9 PLASMABEHANDLUNG VON *BOTRYTIS CINEREA*

Um Sporen und Myzel von *B. cinerea* mit Plasma zu behandeln, wurde dieselbe Vorgehensweise wie für *M. laxa* verwendet. Suspensionen von Sporen und Myzel wurden auf PDA ausplattiert und in einer Zeitreihe unterschiedlich lange mit Plasma behandelt, um die optimale Behandlungsdauer zu ermitteln. Im Gegensatz zu *M. laxa*, haben jedoch Hyphen und Sporen von *B. cinerea* keine deutlich sicht- und unterscheidbaren Kolonien auf den Platten gebildet. Vielmehr wies das Myzel ein sehr feines und flächiges Wachstum auf was dazu führte, dass innerhalb von 24 Stunden die Platten komplett mit feinen Hyphen überzogen waren, wodurch eine Zuordnung zu einzelnen Inokulumquellen optisch nicht mehr möglich war. Aus diesem Grund wurde die Auswertung qualitativ durch fotografische Dokumentation des Wachstums durchgeführt. Die Aufnahmen sind in Abbildung 19 dargestellt. Darauf ist zu erkennen, dass bereits nach 2,5 Minuten Behandlungsdauer eine deutliche Reduktion des Myzelwachstums sowie der Sporenkeimung bewirkt wurde. Bereits nach 5,0 Minuten Behandlungsdauer ist das Wachstum der Hyphen stark reduziert und es sind nur wenige auf der Platte sichtbar. Dabei ist die Wirkung des Plasmas gegen Myzelwachstum etwas besser als gegen Sporenkeimung was daran zu erkennen ist, dass auf den Sporenplatten noch deutlicher Myzel erkennbar ist. Eine komplette Hemmung von Wachstum und Keimung, gekennzeichnet durch leere Platten ohne sichtbares Wachstum, konnte in diesem Versuch sowohl bei Sporen als auch bei Myzel nach 10 Minuten festgestellt werden.

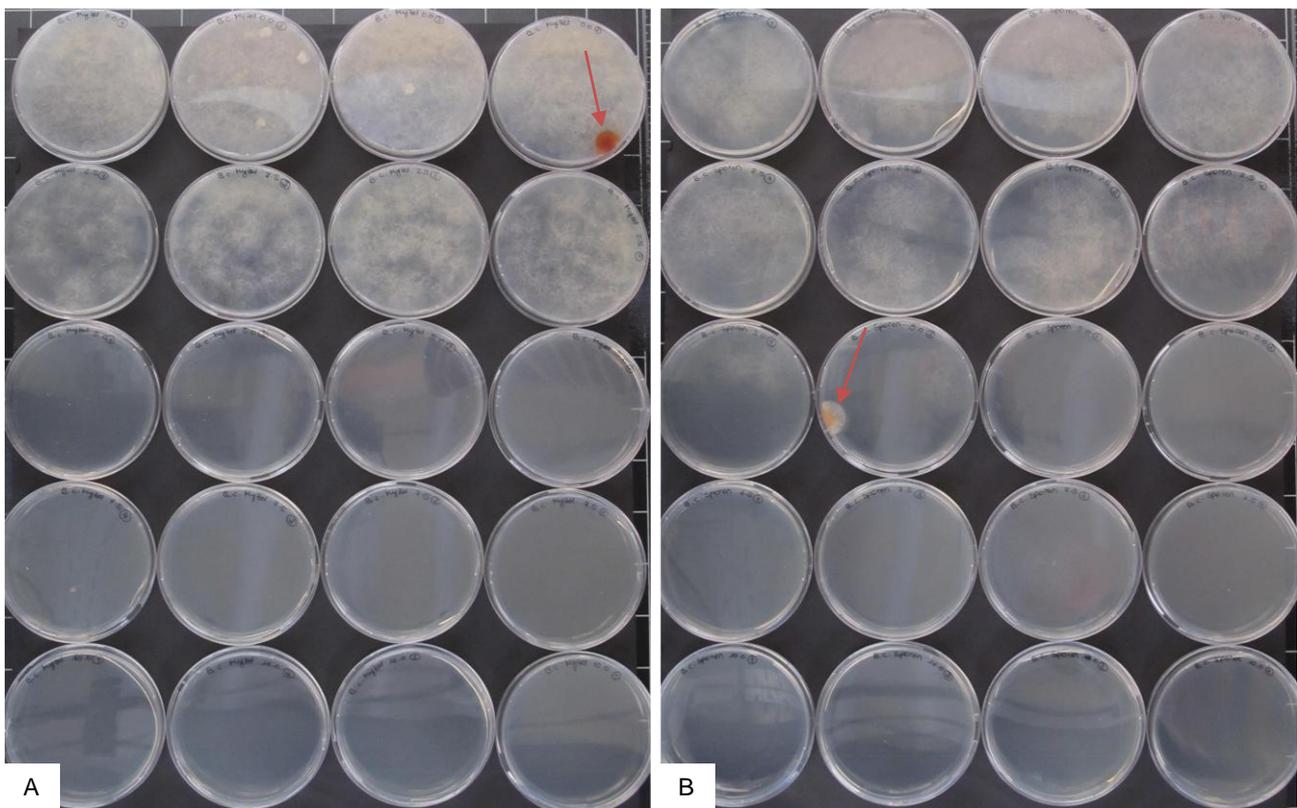


Abbildung 19. Kulturen von *B. cinerea* nach Plasmabehandlungen mit verschiedenen Behandlungszeiten.

Abbildung A: Myzelsuspension von *B. cinerea*, ausplattiert und plasmabehandelt (von oben nach unten: 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 Minuten), je Behandlungsdauer 4 Replikate. B: Sporensuspension von *B. cinerea*, ausplattiert und plasmabehandelt (von oben nach unten: 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 Minuten), je Behandlungsdauer 4 Replikate. Auf beiden Abbildungen ist bereits nach 2,5 Minuten Behandlung eine deutliche Reduktion des Wachstums erkennbar. Mit roten Pfeilen markiert sind Kontaminationen durch fremde Organismen.

Um eine quantitative Auswertung der Versuche zu ermöglichen, wurden in folgenden Versuchen die Suspensionen auf die Platten aufgetropft und nach dem Trocknen in einer Zeitreihe mit Plasma behandelt. Der Nachweis der Wirksamkeit erfolgte dann durch die Messung des aus dem Tropfen gewachsenen Myzel-

durchmessers 1 Tag nach der Plasmabehandlung und dessen Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Dabei wurde wie in Kapitel 3.4 vorgegangen. Um ein vorzeitiges Keimen der Sporen zu verhindern, wurde die Sporensuspension über Nacht gekühlt gelagert und erst vor Ort am IGVP auf die Platten aufgebracht. Die Myzelsuspension wurde dagegen bereits am Vortag auf die Agarplatten aufgebracht, die Platten wurden dann über Nacht im Kühlschrank gelagert um das Wachstum des Myzels zu verlangsamen.

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Plasmabehandlung von Myzel und der anschließenden Auswertung durch Bestimmung des Myzeldurchmessers dargestellt. Der Ausgangsdurchmesser des Inokulums liegt hier bei 1,3 cm, weshalb bei einem Myzeldurchmesser dieser Größe davon ausgegangen wurde, dass kein Wachstum stattgefunden hat. Dies war beispielsweise nach einer Plasmabehandlung von 10 und 7,5 Minuten bei einigen Versuchswiederholungen der Fall. Auch nach 5 Minuten war nur ein geringes Wachstum festzustellen. Und bereits nach 2,5 Minuten Plasmabehandlung konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Wachstumsreduktion beobachtet werden.

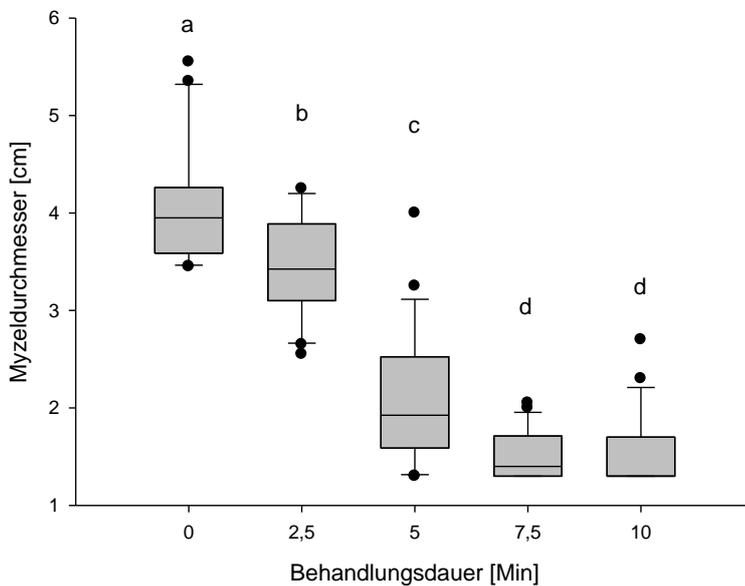


Abbildung 20. Plasmabehandlung von *B. cinerea* Myzel, Zeitreihe. Mit 0 (n = 22) ; 2,5 (n = 22); 5 (n = 22); 7,5 (n = 22) und 10 (n = 21) Minuten Behandlungsdauer. Dargestellt sind 22, bzw. 21 Einzelwerte aus insgesamt 3 unabhängigen Versuchswiederholungen im Boxplot.

Neben Myzel wurden auch Konidien von *B. cinerea* unterschiedlich lange mit Plasma behandelt und im Anschluss der Durchmesser der gewachsenen Kultur im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

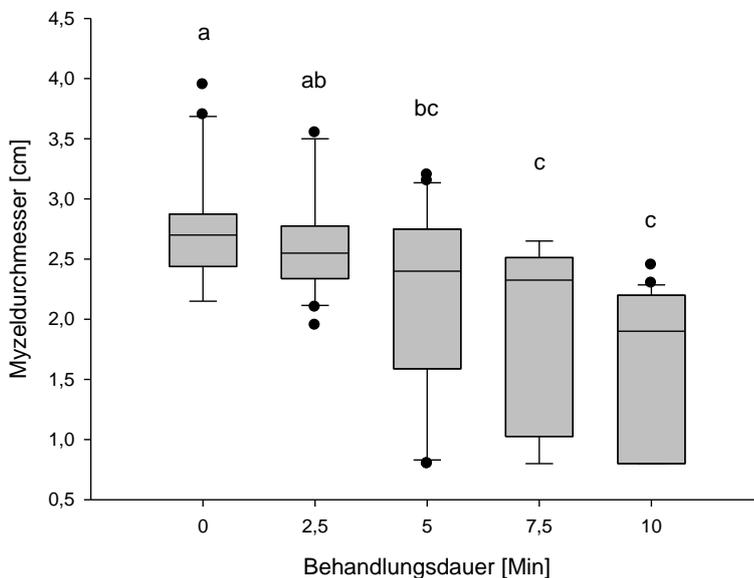


Abbildung 21. Plasmabehandlung von *B. cinerea* Konidien, Zeitreihe. Mit 0; 2,5; 5; 7,5 und 10 Minuten Behandlungsdauer Dargestellt sind je Behandlungsdauer 22 Einzelwerte aus insgesamt 3 unabhängigen Versuchswiederholungen im Boxplot.

Der Ausgangsdurchmesser des Inokulums lag hier bei 0,8 cm, weshalb in diesem Fall davon ausgegangen wurde, dass keine Sporenkeimung mit anschließendem Myzelwachstum stattgefunden hat. Nach einer Behandlungsdauer von 5 Minuten konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein signifikanter Plasmaeffekt beobachtet werden. Allerdings zeigt sich keine Steigerung der Wirkung zwischen 5 und 7,5 sowie 10 Minuten. Es ist demnach kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Varianten erkennbar. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Keimung von Konidien von *B. cinerea* durch eine Plasmabehandlung verhindert werden kann, die Wirkung jedoch nicht so zuverlässig stattfindet wie bei der Behandlung von Myzel, wodurch die Behandlungsdauer und/oder die Behandlungsintensität entsprechend angepasst werden sollte. In den einzelnen Versuchswiederholungen zeigten sich zudem deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit. Teilweise konnte eine Sporenkeimung durch eine Behandlung von 7,5 und 10 Minuten komplett verhindert werden. In anderen Versuchen wiederum, waren die Ergebnisse weniger zuverlässig. Aus diesem Sachverhalt ergibt sich eine verhältnismäßig große Streuung der Einzelwerte um den Median. Auch diese Beobachtungen stützen die Aussage, dass die Plasmabehandlung für Sporen von *B. cinerea* weiter optimiert werden muss.

3.10 PLASMABEHANDLUNG KÜNSTLICH INOKULIERTER ZWETSCHGEN

Vorversuche inokulierte Zwetschgen mit Plasma zu behandeln haben gezeigt, dass die Früchte mit dem üblichen Abstand von 23 cm zum Plasmabrenner während 5 Minuten Behandlungsdauer eine Oberflächentemperatur bis zu 45 °C erreichen. Zudem wurde beobachtet, dass die Beduftung bereits bei 36 °C Oberflächentemperatur zu schmelzen beginnt – ein unerwünschter Nebeneffekt. Erst mit einem Abstand von 27 cm blieb die Temperatur der Fruchthaut unter 36 °C. Eine Behandlung von Myzelsuspension von *M. laxa* in verschiedenen Abständen zur Plasmaquelle hat jedoch gezeigt, dass die Wirksamkeit des Plasmas in Abständen größer als 23 cm signifikant abnimmt. Die Anzahl KBE ist bei einem Abstand von 25 cm zwischen Probe und Plasmaflamme bereits signifikant höher als bei einem Abstand von 23 cm (Abbildung 22).

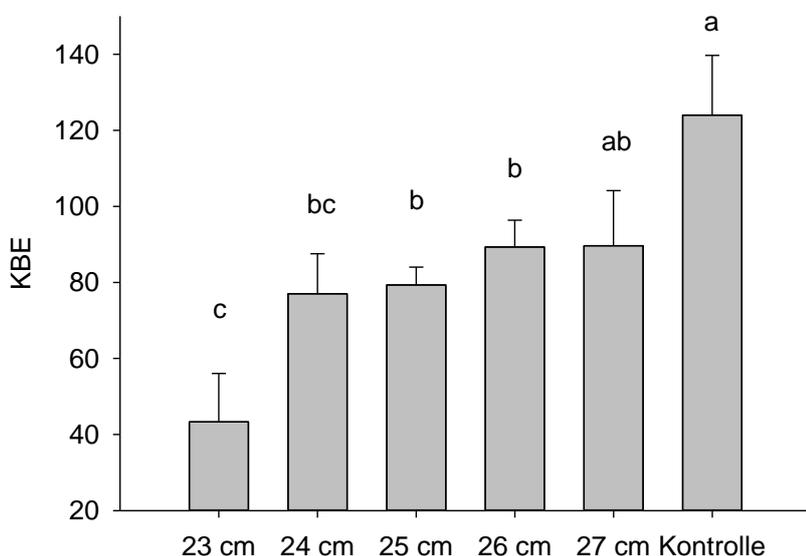


Abbildung 22. Wirkung einer 5-minütigen Plasmabehandlung auf Myzel von *M. laxa* in verschiedenen Abständen zur Plasmaflamme.
Pro Variante n = 3 aus einer Versuchswiederholung.

Daraufhin wurde der Temperaturverlauf großer und kleiner Zwetschgen, sowie gekühlter (Ausgangstemperatur 7 °C) und ungekühlter (Raumtemperatur) Früchte während einer 6-minütigen Plasmabehandlung aufgezeichnet, um die Erwärmung der Fruchthaut mit diesen Parametern kontrollieren zu können. Für die Überprüfung des Größenunterschiedes wurden die verschieden großen Früchte der Sorten Hanka und Hanita verwendet. Die Bestimmung des Fruchtthroughmessers erfolgte durch das Messen des Abstandes zwischen Stiel-

ansatz und Fruchtspitze mit einer digitalen Schieblehre. Wie in Abbildung 23 erkennbar ist, war zwischen „großen“ und „kleinen“ Früchten kein Unterschied im Temperaturverlauf erkennbar.

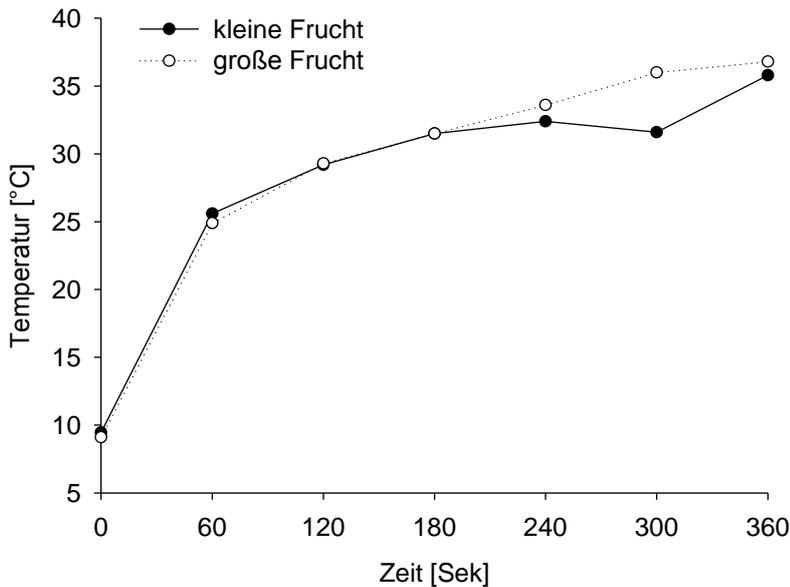


Abbildung 23. Temperaturverlauf großer und kleiner Früchte im Vergleich. Kleine Frucht: Sorte Hanka (mittlerer Ø 43,2 mm), große Frucht: Sorte Hanita (mittlerer Ø 47,8 mm).

Bei gekühlten Früchten mit einer Ausgangstemperatur von etwa 7 °C vor der Plasmabehandlung steigt die Oberflächentemperatur bei einem Abstand von 23 cm von der Plasmaquelle auf etwa 35 °C nach 8 Minuten Behandlung (Abbildung 24). Bei Früchten mit Raumtemperatur als Ausgangstemperatur steigt die Oberflächentemperatur auf 40 °C nach 6 Minuten Plasmabehandlung. Eine übermäßige Erwärmung der Fruchthaut kann somit durch die Verwendung gekühlter Früchte vermieden werden. Die Größe der Frucht spielt jedoch bei der Auswahl der Früchte für einen Versuch keine Rolle.

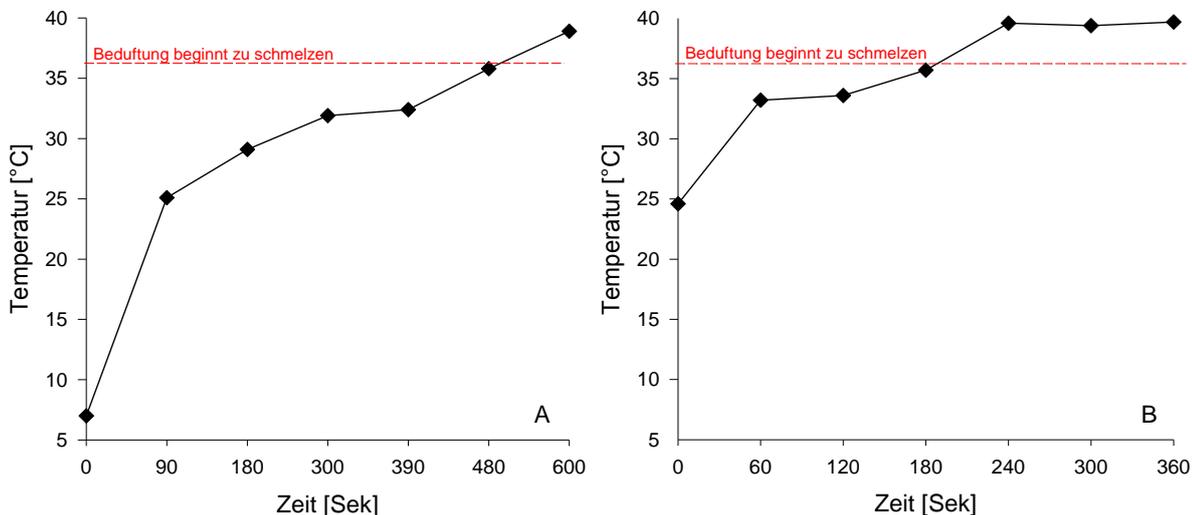


Abbildung 24. Temperaturverlauf der Zwetschenoberfläche.

A: gekühlte Früchte über eine Behandlungsdauer von 10 Minuten. Die kritische Temperatur von 36 °C wird nach 8 Minuten erreicht. B: warme Früchte (Raumtemperatur) über eine Behandlungsdauer von 6 Minuten. 36 °C werden hier bereits nach 3 Minuten erreicht.

Inokuliert wurden die Früchte nach einer Sterilisation ihrer Oberfläche mit 70 % Ethanol und der Verletzung der Fruchthaut mit Sandpapier, mit je 10 µl einer Sporensuspension. Die Früchte wurden dann im sterilen Kunststoffbehälter über Nacht bei 1 °C gelagert, um ein zu starkes Erwärmen der Fruchthaut während der Plasmabehandlung zu vermeiden. Jeweils fünf Früchte wurden 5 Minuten mit Plasma behandelt sowie je fünf Früchte 10 Minuten. Diese zwei Varianten wurden mit je fünf unbehandelten Kontrollfrüchten in sepa-

raten Kunststoffboxen bei Raumtemperatur gelagert. Die Auswertung erfolgte qualitativ (sichtbares Myzelwachstum ja oder nein) und fotografisch sowie quantitativ durch Ausmessen des Läsionsdurchmessers. Nach sechs Tagen zeigte sich auf allen Früchten ein deutliches Myzelwachstum. Optisch konnte jedoch kein Unterschied in der Symptombildung der behandelten Varianten zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Auch zwischen den Behandlungszeiten 5 und 10 Minuten war kein Unterschied erkennbar (Abbildung 42 und Abbildung 43 im Anhang). So zeigen alle Früchte einen deutlich erkennbaren Bewuchs mit Myzel, der sich teilweise auch erkennbar unterscheidet. Jedoch variiert die Stärke der Infektion auch innerhalb der Varianten sichtbar.

In Abbildung 25 ist der mittlere Läsionsdurchmesser der 3 Varianten im Balkendiagramm dargestellt. Auch die quantitative Auswertung ergab keine deutlichen Unterschiede, jedoch lässt sich ein leichter Trend hin zu einem kleineren Läsionsdurchmesser erahnen. Die statistische Auswertung der Daten ergab hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Varianten, unabhängig von der Behandlungszeit.

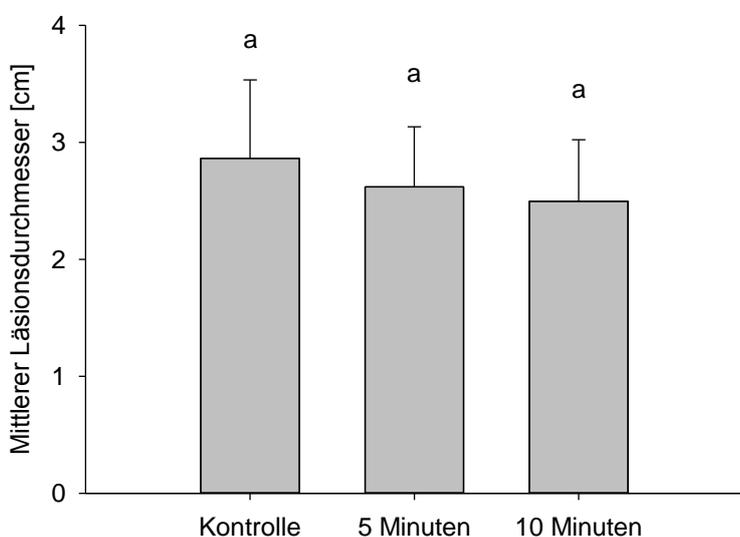


Abbildung 25. Mittlerer Läsionsdurchmesser von *M. laxa* auf Zwetschgen.

Nach 5 und 10 Minuten Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n (Plasma) = 15 beziehungsweise n (Kontrolle) = 25). Dargestellt sind Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen. Bilder der inokulierten Früchte sind im Anhang aufgeführt.

3.11 FRUCHTQUALITÄTSANALYSE PLASMABEHANDELTER ZWETSCHGEN

Um mögliche Auswirkungen der Plasmabehandlung auf die Qualität der Zwetschgen zu überprüfen, wurden ganze Zwetschgen einseitig für 2,5 Minuten mit Plasma behandelt und anschließend die Qualitätsparameter Farbe, Festigkeit, Säure, Zucker, Vitamin C- und der Gehalt an Polyphenolen überprüft. Da für die einzelnen Versuchswiederholungen Zwetschgensorten nach Verfügbarkeit verwendet wurden, sind im Folgenden alle Sorten in jeweils einer Grafik gegenübergestellt. Verglichen wurden immer Werte plasmabehandelter Früchte mit Werten unbehandelter Früchte aus einer Sorte beziehungsweise Versuchswiederholung.

3.11.1 FARBE DER FRUCHTHAUT

Die Färbung der Fruchthaut stellt ein wichtiges optisches Qualitätsmerkmal dar. Da während der Plasmabehandlung UV-Strahlung und Radikale auf die Oberfläche der Zwetschgen treffen, besteht die Möglichkeit, dass dort chemische Reaktionen stattfinden, die die Farbe optisch beeinflussen. Um dies zu überprüfen wurde die Färbung der Fruchthaut mit Hilfe eines Chromameters bestimmt. Dargestellt wurde die Farbe durch den h-Wert in Grad [°].

In Abbildung 26 ist der h-Wert für die Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka dargestellt. In der statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte der plasmabehandelten und der unbehandelten Variante auf signifikante Unterschiede überprüft. Die Grafik macht deutlich, dass sich die Farbe der Früchte im violetten Be-

reich zwischen Blau und Rot befindet. Dabei weist die Hauszwetschge einen etwas höheren Rotanteil auf als die Sorten Hanita und Katinka. Ebenso liegt der Rotanteil bei Katinka etwas über dem der Sorte Hanita.

Die buchstabenbasierte Darstellung der statistischen Auswertung zeigt, dass es zwischen der plasmabehandelten und der unbehandelten Kontrolle der untersuchten Sorten keine Unterschiede in der Farbausprägung der Fruchtschale gibt. Eine Plasmabehandlung von 2,5 Minuten hat demnach keine messbare Auswirkung auf die Färbung der Fruchthaut.

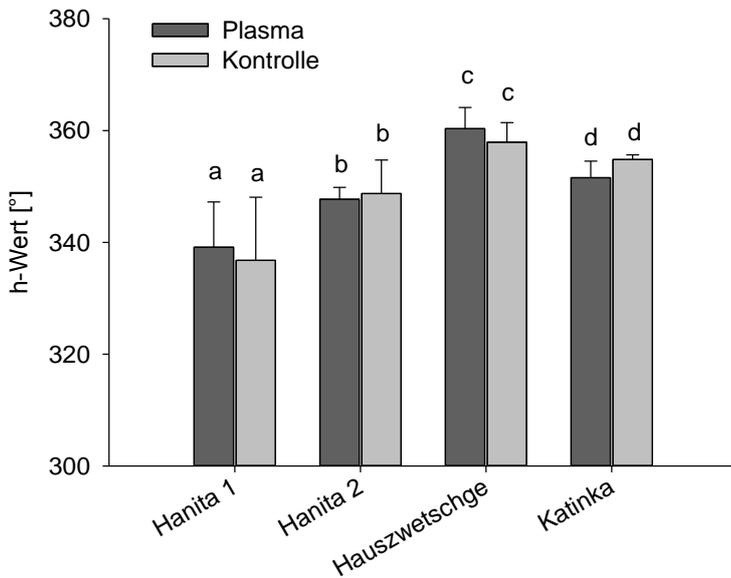


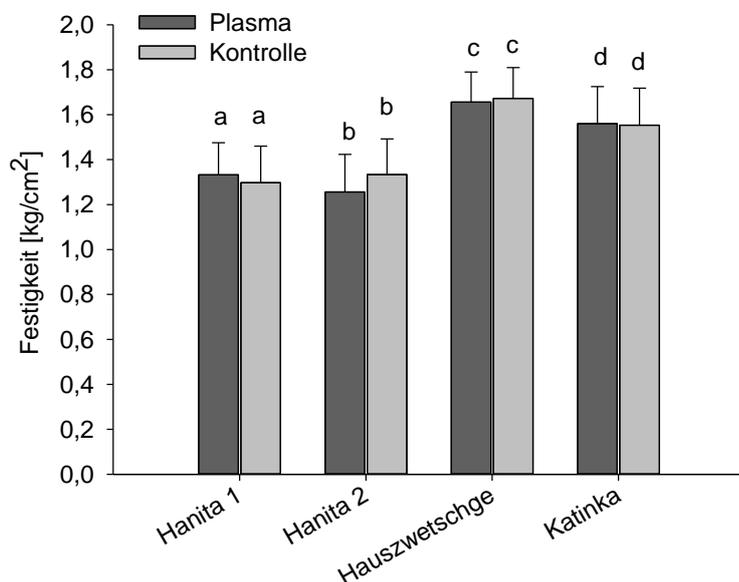
Abbildung 26. Farbe der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Hanita (1: n = 6, 2: n = 6), Hauszwetschge (n = 6) und Katinka (n = 3). Verglichen wurden Werte plasmabehandelter Früchte mit Werten unbehandelter Früchte. Jede Sorte steht als unabhängige Versuchswiederholung.

3.11.2 FRUCHTFLEISCHFESTIGKEIT

Um einen möglichen Effekt der Plasmabehandlung auf die Fruchtfleischfestigkeit von Zwetschgen zu überprüfen, wurde diese nach der Magnus Taylor Methode mit einem halbautomatischen Penetrometer bestimmt. Die Fruchtfleischfestigkeit wurde zweimal für die Sorte Hanita sowie jeweils einmal für die Sorten Hauszwetschge und Katinka bestimmt.

Die Ergebnisse mit statistischer Auswertung sind in Abbildung 27 dargestellt. So sind die Werte für die Festigkeit der Sorte Hanita etwas geringer als für die Sorten Hauszwetschge und Katinka. Jedoch konnte bei



keiner der dargestellten Sorten nach der Plasmabehandlung Unterschiede in der Festigkeit zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine Plasmabehandlung von 2,5 Minuten keine Auswirkungen auf die Fruchtfleischfestigkeit von Zwetschgen hat.

Abbildung 27. Fruchtfleischfestigkeit der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka

Hanita (1: n = 66 / 62, 2: n = 90 / 88), Hauszwetschge (n = 90) und Katinka (n = 90). Verglichen wurden Werte plasmabehandelter Früchte mit Werten unbehandelter Früchte. Jede Sorte steht als unabhängige Versuchswiederholung.

3.11.3 SÄUREGEHALT

Ein weiteres typisches Qualitätskriterium von Früchten, welches neben dem Zucker deutlich den Geschmack beeinflusst, ist der Säuregehalt im Fruchtfleisch. Um zu überprüfen ob eine Plasmabehandlung den Säuregehalt einer Zwetschge nachweisbar beeinflusst, wurde der Gehalt an titrierbaren Säuren mit einem vollautomatischen Titrierroboter aus dem Fruchtsaft plasmabehandelter Fruchthälften bestimmt. Die Säure wurde zweimal für die Sorten Hanita, sowie jeweils einmal für die Sorten Hauszwetschge und Katinka bestimmt. Das Ergebnis wurde in mval / 100 ml angegeben.

In Abbildung 28 ist der Säuregehalt der untersuchten Sorten dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass sich die verschiedenen Sorten im Säuregehalt deutlich unterscheiden. So ist in den Sorten Hauszwetschge und Katinka deutlich weniger Säure enthalten als in der Sorte Hanita. Zwischen den plasmabehandelten Varianten und den Kontrollfrüchten besteht jedoch nach statistischer Auswertung kein signifikanter Unterschied. Die geprüfte Plasmabehandlung hat demnach keinen Einfluss auf den Säuregehalt in Zwetschgen.

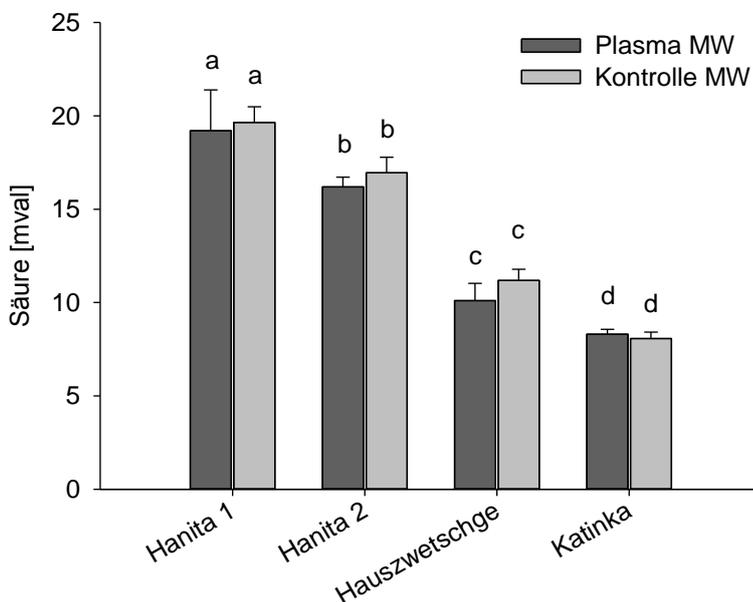


Abbildung 28. Säuregehalt der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Hanita (1: n = 6, 2: n = 6), Hauszwetschge (n = 6) und Katinka (n = 3). Verglichen wurden Werte plasmabehandelter Früchte mit Werten unbehandelter Früchte. Jede Sorte steht als unabhängige Versuchswiederholung.

3.11.4 ZUCKERGEHALT

Für die Bestimmung des Zuckergehaltes wurde für jede Variante ein kleines Aliquot des für die Säurebestimmung hergestellten Fruchtsaftes entnommen und mit einem Refraktometer analysiert. Es sollte so überprüft werden, ob die Plasmabehandlung der Früchte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu einem Unterschied im Zuckergehalt führt.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse für die Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka dargestellt. Insgesamt unterscheidet sich der Zuckergehalt der verschiedenen Sorten nicht wesentlich und liegt etwa zwischen 16 % und 18 %. Auch zwischen den Varianten plasmabehandelt und unbehandelte Kontrolle besteht nach statistischer Auswertung kein signifikanter Unterschied. Auf den Zuckergehalt von Zwetschgen hat eine Plasmabehandlung von 2,5 Minuten demnach keinen Effekt.

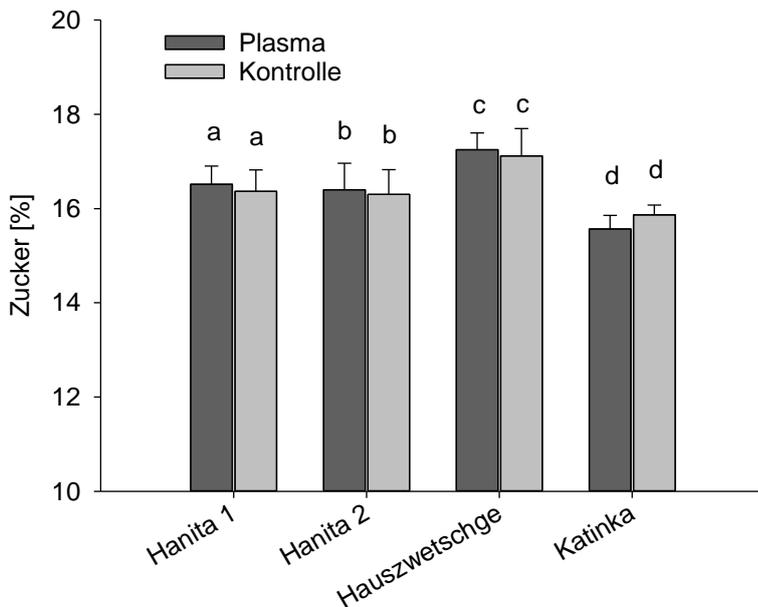


Abbildung 29. Zuckergehalt der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Hanita (1: n = 6, 2: n = 6), Hauszwetschge (n = 6) und Katinka (n = 3). Verglichen wurden Werte plasmabehandelter Früchte mit den Werten unbehandelter Früchte. Jede Sorte steht als unabhängige Versuchswiederholung.

3.11.5 VITAMIN C -GEHALT

Da Zwetschgen vor allem wegen ihres Vitamin C-Gehaltes eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen wird, ist dieser ein wichtiges Qualitätskriterium. Eine Plasmabehandlung sollte deshalb keine negativen Auswirkungen auf den Gehalt an Vitamin C der Zwetschgen haben. Aus diesem Grund wurde mittels HPLC die Vitamin C-Konzentration im Fruchtfleisch der Sorten Hanita und Hauszwetschge nach einer Plasmabehandlung gemessen und mit der Konzentration in unbehandelten Kontrollfrüchten verglichen. Die Vitamin C-Konzentration wurde in mg / 100 g Frischgewicht angegeben.

Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 30 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in Früchten der Sorte Hauszwetschge der Vitamin C-Gehalt mit etwa 1 mg / 100 g Frischgewicht etwas geringer ist als in Früchten der Sorte Hanita mit etwa 1,5 - 2,0 mg / 100 g Frischgewicht.

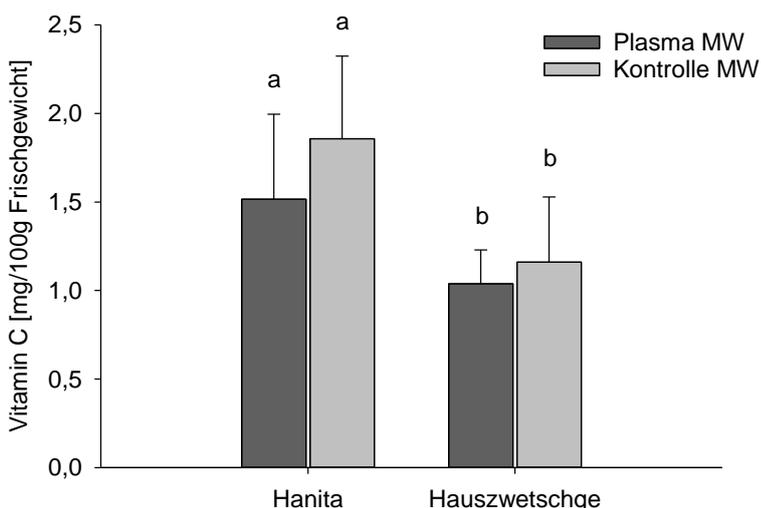


Abbildung 30. Vitamin C-Konzentration der Sorten Hanita und Hauszwetschge.

Hanita (n = 9 bzw. 6) und Hauszwetschge (n = 6). In mg / 100 g Frischgewicht nach 2,5 Minuten Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die statistische Auswertung der Varianten einer Sorte ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund dessen wird davon ausgegangen, dass die Plasmabehandlung bei 2,5 Minuten Behandlungsdauer keine signifikanten Effekte auf den Vitamin C-Gehalt hat. Betrachtet man jedoch die Balken ohne Standardabweichung und statistische Kennzeichnung, ist in beiden Sorten ein Trend hin zu einem geringeren Vitamin C-Gehalt in plasmabehandelten Früchten zu erkennen. So liegt für die Sorte Hanita der Mittelwert der unbehandelten Kontrolle (1,86) 0,34 mg höher als der Mittelwert der plasmabehandelten Variante (1,52). Für

die Sorte Hauszwetschge liegt der Mittelwert der Kontrolle (1,16) um 0,12 mg höher als der Mittelwert der plasmabehandelten Früchte (1,04). Erfahrungsgemäß sind jedoch Unterschiede unter 1 mg durchaus natürlich und beruhen deshalb in diesem Fall nicht auf einer Wirkung des Plasmas (mündliche Absprache mit Dr. Daniel Neuwald aus dem Arbeitsbereich Ernte, Lagerung und Fruchtqualität des KOB).

3.11.6 POLYPHENOLGEHALT

Da während einer Plasmabehandlung UV-Strahlung und Radikale auf die Fruchtoberfläche treffen bestand die Annahme, dass diese Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Polyphenole in den Zwetschgen haben könnten. Ein Teil der für die Fruchtqualität plasmabehandelten Früchte wurden deshalb in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für den Nachweis der enthaltenen Polyphenole mittels HPLC bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Quantifizierung wurden die Phenole in 7 Kategorien unterteilt und mit entsprechenden Wellenlängen dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Phenole in den folgenden Grafiken nach diesen Kategorien sortiert dargestellt. Die vorherrschende Gruppe der Hydroxyzimtsäuren, acylierten Flavonoide, Flavone und Flavonole sind auf zwei Grafiken aufgeteilt.

Abbildung 31 zeigt die Konzentration der in den analysierten Proben nachgewiesenen Hydroxyzimtsäuren in mg / kg Trockensubstanz (TS). Gegenübergestellt sind dabei für jede Verbindung die plasmabehandelte Variante und die unbehandelte Kontrolle. Die Buchstaben zeigen die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Es ist zu erkennen, dass der Gehalt der einzelnen HCAs relativ unterschiedlich sein kann. So sind beispielsweise von HCA3 in etwa 0,13 mg / kg TS enthalten, während von den anderen HCAs mit Werten zwischen 0,01 und 0,03 mg / kg TS deutlich weniger enthalten ist. Im Gegensatz dazu hat der statistische Vergleich der plasmabehandelten und unbehandelten Varianten keinen Unterschied in der Konzentration der einzelnen HCAs ergeben. Eine Plasmabehandlung von 2,5 Minuten hat demnach auf die hier dargestellten phenolischen Verbindungen keinen Einfluss.

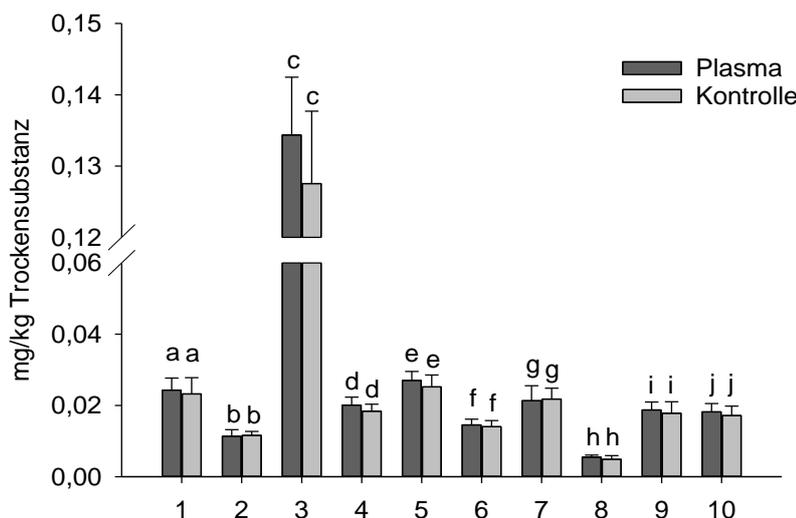


Abbildung 31. Gehalt an Hydroxyzimtsäuren 1-10.

In der folgenden Reihenfolge: HCA1, HCA2, HCA3, HCA4, HCA5, HCA6, HCA7, HCA8, HCA8.1, HCA9. Jeweils n = 9. Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen.

In Abbildung 32 ist die Konzentration an spezifischen Hydroxyzimtsäuren, Flavonoiden, Flavonen und Flavonolen in den analysierten Proben in mg / kg TS dargestellt. Auch hier sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Während von 3-p-Cumaroalylchinasäure, Feruloylchinasäure, Flavon und Flavonol weniger als 0,1 mg / kg TS enthalten sind, konnten von n-Chlorogensäure etwa 0,2 mg / kg TS und von Neochlorogensäure etwa 1,5 mg / kg TS detektiert werden. Die 2,5-minütige Plasmabehandlung hatte jedoch auch hier im Ver-

gleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration der dargestellten phenolischen Verbindungen.

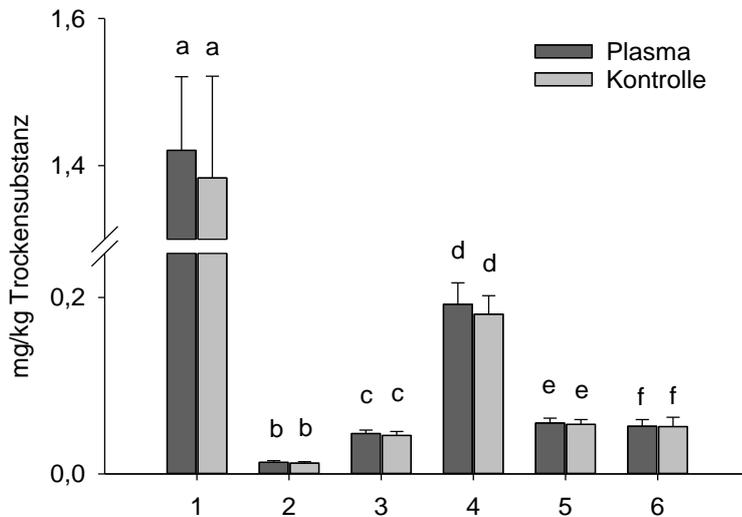


Abbildung 32. Gehalt an Hydroxyzimtsäuren, Flavonen und Flavonolen 1-6.

In der folgenden Reihenfolge: 1: Neochlorogensäure, 2: 3-p-Cumaroarylchinasäure, 3: Feruloylchinasäure, 4: n-Chlorogensäure, 5: Flavon, 6: Flavonol. Jeweils n = 9 Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen.

Neben den gezeigten hauptsächlich in Zwetschgen vorkommenden HCAs, konnten in den analysierten Proben auch 3 nicht näher charakterisierte phenolische Verbindungen nachgewiesen werden. Diese sind in Abbildung 33 als unbekannte phenolische Verbindungen 1, 2 und 3 bezeichnet dargestellt. Auch diese Verbindungen unterscheiden sich in ihrem Gehalt deutlich voneinander, sind aber insgesamt in deutlich geringeren Konzentrationen enthalten als die in den vorangegangenen Abbildungen dargestellten HCAs, Flavonen und Flavonolen. Die statistische Auswertung der Daten hat auch hier ergeben, dass die beschriebene Plasmabehandlung keinen signifikanten Effekt auf den Gehalt der Substanzen hat, wenn sie mit unbehandelten Kontrollvarianten verglichen wird.

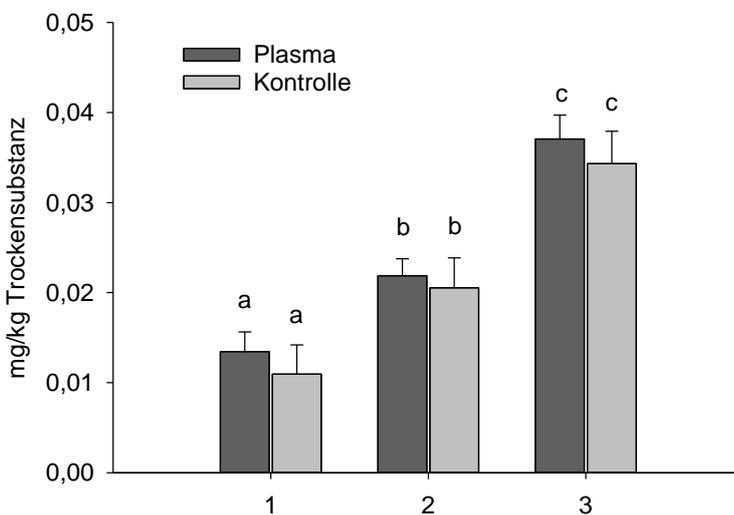


Abbildung 33. Gehalt unbekannter phenolischer Verbindungen Nr. 1, 2, 3.

Mit jeweils n = 9 Einzelwerten aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen.

In Abbildung 34 ist der Gehalt an Anthocyanen in den untersuchten Fruchtproben dargestellt. Auch hier sind wiederum für jede Substanz die plasmabehandelte Variante und die unbehandelte Kontrolle gegenübergestellt. Die buchstabenbasierte Darstellung zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung. Insgesamt unterscheiden sich auch die Anthocyane in ihrer Konzentration recht deutlich. Während von Cyanidin 3-Glukosid und Päonidin 3-Rutinosid Werte zwischen 0,2 und 0,3 mg / kg TS berechnet wurden, ist von der Verbindung Cyanidin 3-Rutinosid mit etwa 1,4 mg / kg TS etwa 5- bis 7- mal so viel enthalten. Die statistische Auswertung der Daten ergab auch für die nachgewiesenen Anthocyane keine signifikanten Unterschiede zwischen plasmabehandelter und unbehandelter Variante.

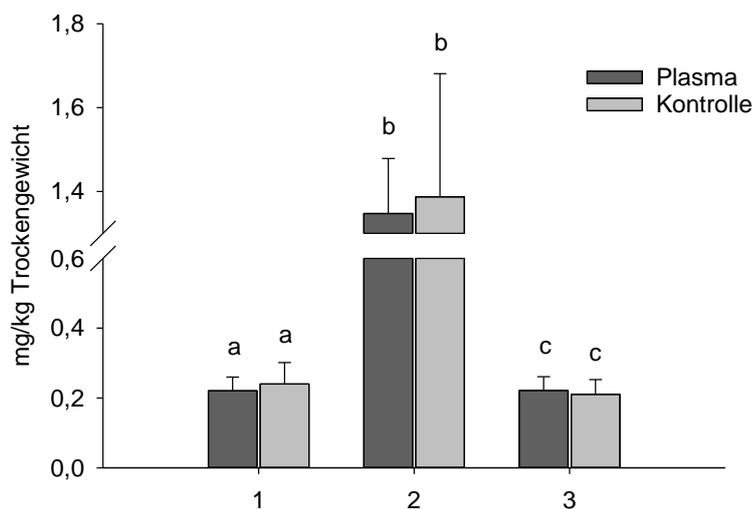


Abbildung 34. Gehalt an Anthocyanen 1 – 3. In der folgenden Reihenfolge: Cyanidin 3-Glukosid, Cyanidin 3-Rutinosid, Päonidin 3-Rutinosid. N = 9 Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen.

3.12 FRUCHTQUALITÄTSANALYSE PLASMABEHANDELTER ERDBEEREN

Um mögliche Auswirkungen der Plasmabehandlung auf die Qualität von Erdbeeren zu überprüfen, wurden ganze Früchte für 2,5 Minuten mit Plasma behandelt und anschließend die Qualitätsparameter Farbe, Festigkeit, Säure- und Zuckergehalt überprüft. Zudem wurden die optisch sichtbaren Unterschiede fotografisch dokumentiert. Die Analysen wurden jeweils am Tag vor der Plasmabehandlung, sowie zur zusätzlichen Überprüfung der Lagerfähigkeit, drei Tage nach der Plasmabehandlung durchgeführt. Jeweils eine Schale Erdbeeren diente dabei als Wiederholung. Insgesamt wurden je Variante drei Schalen mit jeweils 20-30 Früchten verwendet.

Drei Tage nach der Plasmabehandlung wurden zunächst mit einer Digitalkamera Aufnahmen der Früchte gemacht. Durch die Erwärmung der Früchte bei der Plasmabehandlung wurden diese stark in Mitleidenschaft gezogen und verloren dabei wichtige Merkmale ihrer optischen Attraktivität. Der direkte Vergleich unbehandelter und plasmabehandelter Früchte ist in Abbildung 35 gezeigt. Plasmabehandelte Früchte tragen vertrocknete Kronblätter, welche die Erdbeeren nicht mehr frisch wirken lassen. Der Zustand der Kronblätter wurde hier in Stufe 3 „welk“ eingeordnet. Zudem sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich vergrößerte Druckstellen zu erkennen. Es wurden mehr Früchte als „stark beschädigt“ bewertet als bei der unbehandelten Kontrolle. Jedoch haben durch den Transport auch unbehandelte Früchte deutliche Druckstellen erlitten und wurden teilweise als „stark beschädigt“ bewertet. Insgesamt ist in dieser Variante die Standardabweichung jedoch relativ hoch und lässt einen zuverlässigen Vergleich mit den plasmabehandelten Früchten nicht zu (Abbildung 36). Da im Vergleich zu den Früchten direkt nach der Ernte ein großer Unterschied besteht kann davon ausgegangen werden, dass ein großer Teil der Beschädigungen durch den Transport der Früchte zustande gekommen ist. An Glanz haben ebenfalls sowohl die unbehandelten Kontrollfrüchte als auch die plasmabehandelten Früchte etwas verloren, es ist zwischen den beiden Varianten kein Unterschied erkennbar. Die Lagerfähigkeit an sich wurde jedoch durch die Plasmabehandlung nicht beeinträchtigt, was dadurch gezeigt wurde, dass keine Fäulen aufgetreten sind (Abbildung 35). In Abbildung 37 ist die Fruchtfleischfestigkeit der Erdbeeren direkt nach der Ernte, sowie nach der Plasmabehandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollfrüchten dargestellt. Durch die Lagerung und den Transport der Früchte hat die Festigkeit deutlich abgenommen. Durch die Plasmabehandlung wurde dieser Qualitätsparameter jedoch nicht beeinflusst.



Abbildung 35. Qualitativer Vergleich unbehauelter und mit Plasma behandelten Erdbeeren.

A: Direkter Vergleich unbehauelter und plasmabehauelter Erdbeeren in der Transportbox. B: Unbehauelte Erdbeeren mit frischen, hellgrün leuchtenden Kronenblättern, vereinzelte Druckstellen sichtbar. C: Plasmabehauelte Erdbeeren mit trockenen, dunkelgrünen Kronblättern, deutlich vergrößerten Druckstellen und sichtbarem Glanzverlust.

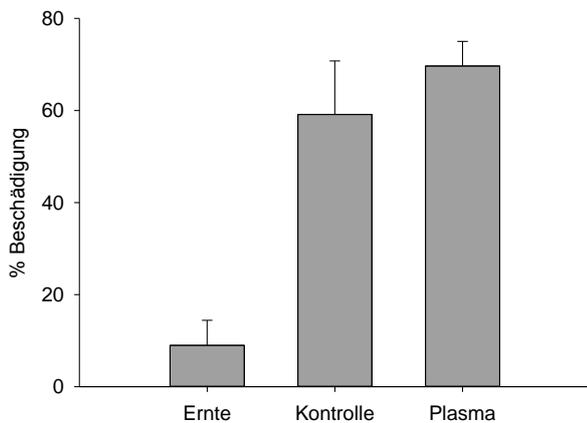


Abbildung 36. Beschädigung der Fruchtoberfläche von Erdbeeren durch die Plasmabehandlung.

Optisch war ein deutlicher Unterschied im Grad der Beschädigung zwischen unbehauelter Kontrolle und plasmabehauelten Früchten erkennbar. Durch die Standardabweichung von knapp 12 % ist eine zuverlässige Aussage jedoch nicht möglich ($n(\text{Kontrolle}) = 88$, $n(\text{Plasma}) = 66$).

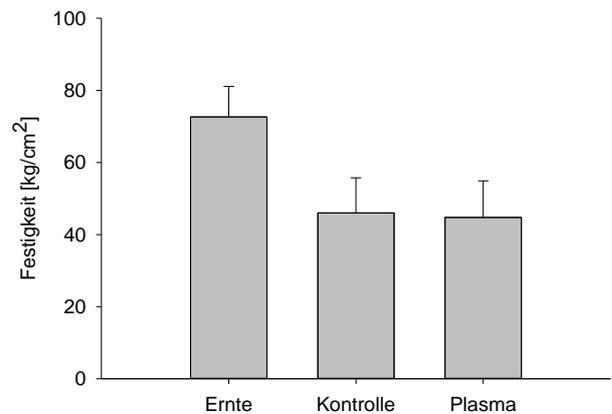


Abbildung 37. Fruchtfleischfestigkeit plasmabehauelter Erdbeeren.

Durch die Plasmabehandlung wurde die Fruchtfleischfestigkeit der Früchte nicht beeinträchtigt ($n = 3 \times 20$ je Variante).

Auch die weiteren Fruchtqualitätsparameter zeigen keine Veränderung durch die Plasmabehandlung (siehe Abbildung 38-Abbildung 40).

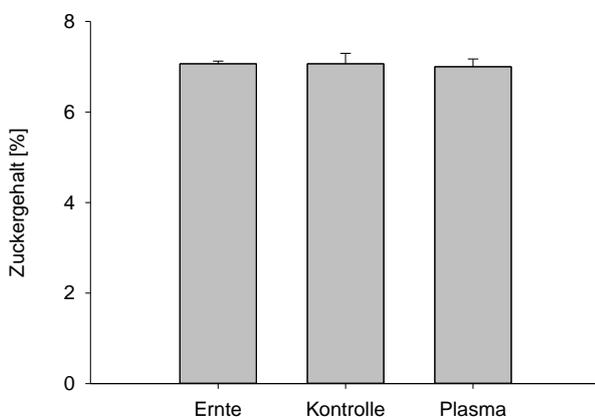


Abbildung 38. Zuckergehalt plasmabehauelter Erdbeeren.

Der Zuckergehalt der Früchte wurde weder durch die Lagerung noch durch die Plasmabehandlung beeinflusst ($n = 20$).

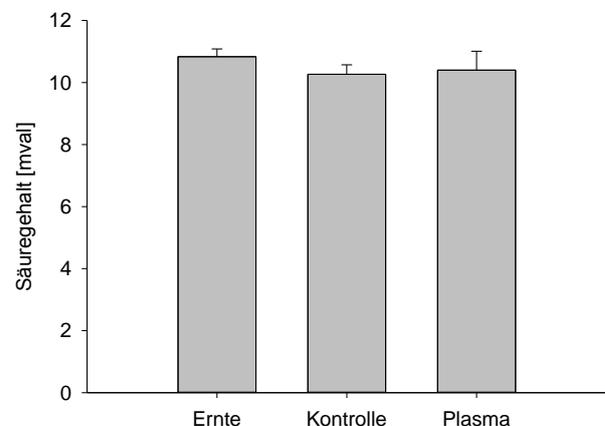


Abbildung 39. Säuregehalt plasmabehauelter Erdbeeren.

Der Gehalt an titrierbaren Säuren in den Erdbeeren wurde durch die Plasmabehandlung nicht beeinflusst ($n = 20$).

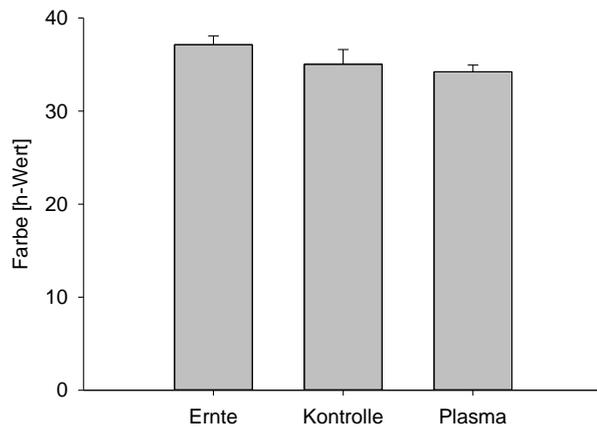


Abbildung 40. Farbe der Fruchthaut plasmabehandelter Erdbeeren.

Ein Einfluss der Plasmabehandlung auf die Farbe der Fruchthaut konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum Zustand der Frucht zum Erntezeitpunkt sind im Gehalt an Zucker und Säure sowie bei der Farbe der Fruchthaut keine Unterschiede feststellbar. Daraus kann geschlossen werden, dass vor allem der Transport der Früchte und ihre Lagerung die Fruchtqualität optisch sichtbar beeinträchtigen. Durch die Plasmabehandlung wurden vor allem die Kronblätter geschädigt, was an der Durchführungsweise der Plasmabehandlung (Ansaugen der Frucht) und die Wärme des Plasmas erklärt werden kann.

3.13 UNTERSUCHUNGEN ZU DEN WIRKMECHANISMEN DES PLASMAS

Um genauere Aussagen zu den Wirkmechanismen des Plasmas machen zu können, wurden Myzelsuspensionen von *M. laxa* auf PDA-Platten mit verschiedenen Bestandteilen des Plasmas jeweils 5 Minuten behandelt. Dazu sollte die elektromagnetische Strahlung, wie beispielsweise UV und VUV, und die Teilchen aus dem Plasma wie zum Beispiel Elektronen, Ionen und Neutrale, getrennt werden. Durch Anbringen eines optischen MgF_2 -Filters auf den PDA-Platten wurden die im Plasma vorhandenen Radikale abgeschirmt. Da jedoch das Material MgF_2 bis in den Vakuum-UV Bereich transparent ist, erreicht das gesamte Lichtspektrum des Plasmas die Myzelbestandteile. Im Vergleich dazu wurden Platten mit dem ungefilterten Plasma behandelt. Bewertet wurde die jeweilige Wirkung auf das Wachstum der Hyphen durch zählen der KbE. Als Negativkontrollen dienten Platten die nicht behandelt wurden.

In Abbildung 41 sind die KbE der untersuchten Varianten aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen dargestellt.

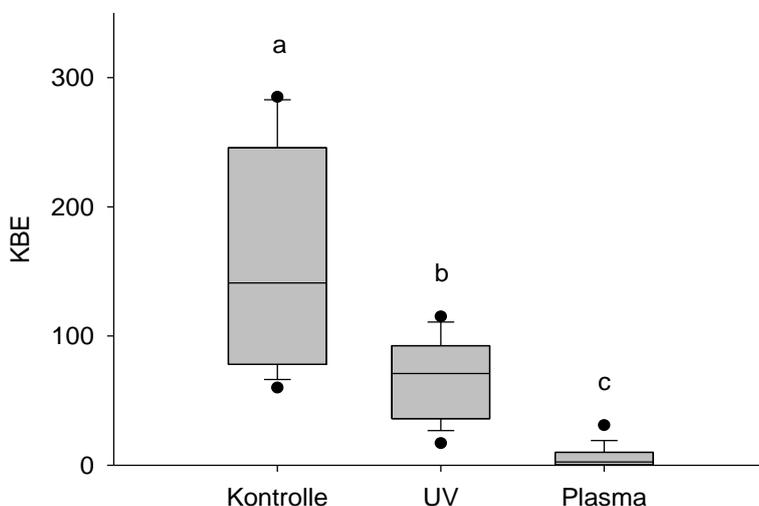


Abbildung 41. Effekt der Wirkmechanismen des Plasmas auf Myzel von *M. laxa*.

KbE nach Behandlung mit UV-Strahlung (Abschirmung der Radikale im Plasma durch optische MgF_2 -Filter) und ungefiltertem Plasma. Dargestellt sind Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen ($n = 16$).

Sowohl durch eine Behandlung mit UV-Strahlung als auch durch die Behandlung mit dem gesamten Plasma ergaben sich signifikant unterschiedliche Zahlen von KbE auf den Platten im Vergleich zur unbehandelten

Kontrolle (Median = 141 KbE). Jedoch unterscheiden sich auch die Zahlen von UV-Behandlung und Plasmabehandlung signifikant voneinander. So liegt der Median der UV-behandelten Variante bei 71 KbE und der Median der plasmabehandelten Variante bei 2,5 KbE. Anhand dieser Resultate kann davon ausgegangen werden, dass durch die synergistische Wirkung von Radikalen und UV-Strahlung ein dekontaminierender, sterilisierender Effekt von Plasma im Vergleich zu reiner UV-Strahlung wesentlich verbessert wird.

3.14 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Das Ziel der beschriebenen Versuche war der Nachweis einer grundsätzlichen Eignung einer Plasmabehandlung von Zwetschgen und Erdbeeren mit einem Mikrowellenplasmabrenner bei Atmosphärendruck zur Abtötung von Sporen und Myzel der Fruchtfäuleerreger *Monilia spp.* und *Botrytis cinerea*. Beispielhaft für die drei vorwiegend im Obstbau vorkommenden *Monilia*-Arten *M. laxa*, *M. fructigena* und *M. fructicola* wurden die Versuche mit *M. laxa* durchgeführt. Dabei wurden sowohl Agarplatten und eine PET-Folie als auch Zwetschgen und Erdbeeren als Substrate für das Inokulum eingesetzt.

Um mögliche Nebeneffekte und Besonderheiten der Plasmabehandlung berücksichtigen zu können, wurde zunächst eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass Agarplatten durch eine gute Kompensation der Plasmawärme gut als Modellsubstrat geeignet sind. Nach 10 Minuten Behandlungsdauer wurde hier eine maximale Temperatur von 38,3 °C gemessen. Auch eine PET-Folie kann grundsätzlich als Modellsubstrat für Sporen verwendet werden. Allerdings sollte hier ein geeignetes Kühlmittel eingesetzt werden, da die Folie andernfalls innerhalb weniger Sekunden eine Temperatur von über 70 °C erreicht. Mit Kühlung durch Alkohol erreichte die Folientemperatur ein Maximum von 36,2 °C. In diesem Temperaturbereich kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung einer Plasmabehandlung nicht durch den Wärmeeintrag beeinflusst wird, da eine Wärmebehandlung von Myzel und Sporen mit Temperaturen bis 50 °C nicht zu einem verringerten Wachstum von Myzel bzw. einer verringerten Keimung von Sporen geführt hat.

Bei den Vorversuchen zur Plasmabehandlung von *Monilia*-Myzel auf PDA konnte bereits nach 5 Minuten ein signifikanter Unterschied im Myzelwachstum festgestellt werden. Ein Effekt durch die Myzeldichte konnte mit diesen Versuchen nicht ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wurde bei den Vorversuchen zur Plasmabehandlung von Sporen auf PDA keine Wirkung nachgewiesen. In daraufhin durchgeführten Zeitreihen wurde auch nach 10 Minuten Plasmabehandlung keine signifikante Abtötung von Sporen erreicht. Dagegen konnte bei Myzel nach 5 Minuten eine signifikante Abtötung erreicht werden. Jedoch wurde auch hier erst bei einer Behandlungsdauer von 10 Minuten eine Reduktion von 92,2 % und eine zuverlässige Konstanz innerhalb der einzelnen Versuche erreicht.

Die Plasmabehandlung von Myzel von *Botrytis cinerea* hat bereits nach 2,5 Minuten ein signifikant reduziertes Wachstum bewirkt. Mit zunehmender Behandlungsdauer wurden die hemmenden Effekte deutlicher. So ist nach 5 Minuten nur ein geringes Wachstum festzustellen, nach 7,5 und 10 Minuten konnte das Wachstum des Myzels in den meisten Versuchswiederholungen vollständig gehemmt werden. Im Gegensatz dazu, konnte nach der Plasmabehandlung von Sporen erst nach einer Behandlungsdauer von 5 Minuten ein inhibierender Effekt auf die Sporenkeimung beobachtet werden. Zudem war teilweise auch nach 10 Minuten Behandlungsdauer noch Sporenkeimung und Myzelwachstum zu beobachten. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Behandlungsdauer für Sporen für einen zuverlässigen Effekt weiter erhöht und die Behandlungsparameter weiter angepasst werden müssen, die Wirkung gegen Sporen von *B. cinerea* jedoch zuverlässiger stattfindet als gegen Sporen von *M. laxa*.

Eine künstliche Inokulation von Zwetschgen konnte nur mit oberflächlich verletzten Früchten erreicht werden. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit Sporensuspension erreicht. Eine Vorinkubation der Sporen in Zuckerlösung brachte keine Verbesserung der Inokulationsrate. Es wurde festgestellt, dass ab einer Oberflächentemperatur von 36 °C die Beduftung der Zwetschgen optisch sichtbar zu schmelzen beginnt. Um dies zu verhindern, wurden für die Plasmabehandlungen nur gekühlte Zwetschgen eingesetzt. Eine Infektion der Früchte konnte jedoch durch die Plasmabehandlung nicht verringert oder verhindert werden.

Die Fruchtqualitätsanalysen plasmabehandelter Zwetschgen haben keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle ergeben. Untersucht wurden dabei nach einer 2,5 minütigen, einseitigen Plasmabehandlung die Farbe der Fruchthaut, die Fruchtfleischfestigkeit, sowie der Gehalt an Zucker, Säure, Vitamin C und Polyphenolen. Die Temperatur der Früchte während der Plasmabehandlung, die einseitige Behandlung sowie die kurze Behandlung von 2,5 Minuten hat dabei die Wirkung des Plasmas nicht nachweisbar beeinflusst.

Die Lagerfähigkeit plasmabehandelter Erdbeeren wurde durch die Plasmabehandlung nicht beeinträchtigt. Auch die Fruchtqualitätsparameter Festigkeit, Zucker- und Säuregehalt sowie die Farbe der Fruchtoberfläche wurden dadurch nicht verändert. Vor allem der Transport der Früchte und ihre Lagerung haben die optische Fruchtqualität beeinträchtigt. Durch den Transport wurden Druckstellen verursacht, welche die Attraktivität der Früchte deutlich reduziert haben. Durch die Plasmabehandlung wurden vor allem die Kronblätter geschädigt. Diese sind durch das Ansaugen der Frucht und die Wärme des Plasmagases ausgetrocknet.

Dass die Wirkung des Plasmas auf einer Synergie aus UV-Strahlung und Radikalen beruht, konnte durch den Vergleich verschieden behandelte Varianten von Myzelsuspensionen gezeigt werden. So konnte zwar bereits durch die UV-Strahlung eine signifikante Abtötung der Hyphen erreicht werden, der Wirkungsgrad einer Behandlung mit dem vollständigen Plasma war jedoch signifikant höher als bei einer Behandlung mit dem UV-Bestandteil des Plasmas durch Abschirmen der Radikale mit Hilfe eines MgF₂ Plättchens.

Die Hypothese, dass die Plasmabehandlung von *Monilia laxa* und *Botrytis cinerea* zu einer signifikanten Reduktion des Wachstums von Myzel und der Keimung von Sporen führt, konnte mit dieser Arbeit teilweise bestätigt werden. Eine für eine verbesserte Haltbarkeit der Früchte notwendige Reduktion von mehr als 90 % der wachstumsfähigen Hyphen wurde bei *M. laxa* nach einer 10-minütigen Plasmabehandlung einer Myzelsuspension auf Agarplatten erreicht. Eine genaue Quantifizierung der Reduktion von *B. cinerea* Myzel und Sporen konnte mit dieser Versuchsdurchführung nicht erreicht werden. Die Abtötung von *Monilia*- und *Botrytis*-Myzel zeigt einen charakteristischen, 3-phasigen Verlauf. Dabei sind die Hauptwirkmechanismen des mit Raumluft erzeugten Plasmas UV-Strahlung aus angeregten NO-Molekülen sowie Sauerstoffradikale. Das Zusammenwirken dieser Mechanismen wurde durch das Abschirmen der Radikale mit Hilfe eines MgF₂ Filters während Plasmabehandlungen bestätigt. Das Keimen der Sporen von *M. laxa* konnte mit einer Plasmabehandlung von bis zu 10 Minuten nicht verhindert werden. Dagegen wurde bei *B. cinerea* durchaus ein inhibierender Effekt beobachtet.

Es hat sich gezeigt, dass für die künstliche Inokulation intakter Zwetschgenoberflächen bestimmte Bedingungen erforderlich sind. Eine Plasmabehandlung inokulierter Früchte mit verletzten Oberflächen hat nicht den erwünschten Effekt gebracht, da der Erreger im Fruchtfleisch für die Plasmabestandteile nicht mehr erreichbar war.

Die Analyse der wichtigsten Qualitätsparameter plasmabehandelter Zwetschgen hat ergeben, dass die durchgeführte Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wie erwartet keine Effekte auf Farbe, Fruchtfleischfestigkeit, Zucker- und Säuregehalt, die Vitamin C-Konzentration und das Polyphenolspektrum bewirkt hat. Ähnliche Beobachtungen wurden bei plasmabehandelten Erdbeeren gemacht. Auch hier konnte kein Effekt der Plasmabehandlung auf die untersuchten Qualitätsparameter nachgewiesen werden. Durch die Wärme des Plasmas wurden die Kronblätter ausgetrocknet und bewirkten eine verringerte Attraktivität der Frucht.

Durch die Erwärmung der Substrate während der Plasmabehandlung und den damit einhergehenden Energieverlust erscheint der eingesetzte Mikrowellen-Plasmabrenner deshalb für eine praktische Anwendung nicht geeignet. Durch den Einsatz einer kalten Plasmaquelle (DBE) könnten die Plasmaparameter für eine verbesserte Wirksamkeit entsprechend angepasst, die Behandlungen gleichzeitig ohne Erwärmung des Substrates und damit deutlich günstiger und effizienter durchgeführt werden. In diesem Fall sollten dann jedoch auch Grundlagenuntersuchungen zur Wirkung dieser Technik auf Sporen und Myzel sowie die Fruchtqualität durchgeführt werden.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass eine Plasmabehandlung in der Nachernte mehrere Vorteile bieten kann (beispielsweise keine Rückstände, energiesparende Anwendungsmöglichkeiten, kein Stoffeintrag in die Umwelt), ihre Wirksamkeit jedoch von mehreren Faktoren abhängig ist. Neben dem Zielorganismus und dem Substrat spielen auch die Technik der Plasmaerzeugung, die Zusammensetzung des Arbeitsgases sowie die Anwendungsmöglichkeiten in der Praxis eine bedeutende Rolle. Eine individuelle Anpassung der Technik an die jeweiligen Bedingungen ist demnach in jedem Fall separat erforderlich.

4 Literaturverzeichnis

Adaskaveg, J. E., Förster, H., und Thompson, D. F., 2000. Identification and etiology of visible quiescent infections of *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea* in sweet cherry fruit. *Plant Disease*, 84, 328-333.

Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., & Daszak, P. , 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 19 (10), 535-544.

Arndt, S., Unger, P., Wacker, E., Shimizu, T., Heinlin, J., Li, Y. F., Karrer, S., 2013. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 8, e79325.

Benito, E.P., Ten Have, A., Van 'T Klooster, J.W., Van Kan, J.A.L., 1998. Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 207-220.

Byrde, R.J.W., Willetts, H.J., 1977. *The Brown Rot Fungi of Fruit: Their Biology and Control*. Pergamon Press, Oxford, New York, USA.

Cheng, X., Sherman, J., Murphy, W., Ratovitski, E., Canady, J., Keidar, M., 2014. The effect of tuning cold plasma composition on glioblastoma cell viability. *PLoS ONE*, 9, e98652.

Diehl, J.M., Staufenbiel, T., 2007. *Statistik mit SPSS für Windows. Version 15*, D. Klotz Verlag, Eschborn, Deutschland.

Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., Von Woedtke, T., Brandenburg, R., Weltmann, K. D., 2011. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44, 013002, 1-18.

Games, P. A. and Howell, J. F., 1976. Pairwise multiple comparison procedures with unequal n's and/or variances: a Monte Carlo study. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 1, 113-125.

Gombotz, W. R. und Hoffman, A. S., 1987. Gas-discharge techniques for biomaterial modification. *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 4, 1-42.

Gorynia, S., Koban, I., Matthes, R., Welk, A., Gorynia, S., Hübner, N. O., Kramer, A., 2013. In vitro efficacy of cold atmospheric pressure plasma on *S. sanguinis* biofilms in comparison of two test models. *GMS Hygiene and Infection Control*, 8, Doc 01, 1-9.

Hinrichs-Berger, J., Müller, G., 2010. First record of *Monilinia fructicola* on blackberry fruits. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117, 110.

- Holb, I., 2008. Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance and biological control. *International Journal of Horticultural Science*, 14, 15-21.
- Jaccard, J., Becker, M. A., Wood, G., 1984. Pairwise multiple comparison procedures: a review. *Psychological Bulletin*, 96, 589.
- Janzen, G., 1992. *Plasmatechnik: Grundlagen, Anwendungen, Diagnostik*. Hüthing Buch Verlag GmbH Heidelberg.
- Janzen, O., 2011. Untersuchungen zur entkeimenden Wirkung eines Mikrowellenplasmas. Diplomarbeit, IGVP, Universität Stuttgart, Deutschland.
- Leins, M., 2010. Development and spectroscopic investigation of a microwave plasma source for the decomposition of waste gases. Dissertation, IGVP, Universität Stuttgart, Deutschland.
- Leins, M., Walker, M., Schulz, A., Schumacher, U., Stroth, U., 2012. Spectroscopic Investigation of a Microwave-Generated Atmospheric Pressure Plasma Torch. *Contributions to Plasma Physics*, 52, 615-628.
- Leins, M., Gaiser, S., Schulz, A., Walker, M., Schumacher, U., Hirth, T., 2015. How to ignite an atmospheric pressure microwave plasma torch without any additional igniters. *Journal of Visualized Experiments*, 98, video article e52816.
- Levene, H., 1960. Robust tests for equality of variances. *Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling*, 2, 278-292.
- Lilliefors, H. W., 1967. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. *Journal of the American Statistical Association*, 62, 399-402.
- Manganaris, G., Vicente, A., Crisosto, C., 2008. Effect of pre-harvest and post-harvest conditions and treatments on plum fruit quality. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3, 1-9.
- Marquenie, D., Geeraerd, A.H., Lammertyn, J., Soontjens, C., Van Impe, J.F., Michiels, C.W., Nicolai, B.M., 2003. Combinations of pulsed white light and UV-C or mild heat treatment to inactivate conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena*. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 185-196.
- Massey Jr, F. J., 1951. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *Journal of the American Statistical Association*, 46, 68-78.
- Nehra, V., Kumar, A., Dwivedi, H., 2008. Atmospheric non-thermal plasma sources. *International Journal of Engineering*, 2, 53-68.
- Neuwald, D.A., Streif, J., 2010. Changes in ascorbic acid content of 'Elstar' and 'Jonagold' apples treated pre- and post-harvest with ripening inhibitors. *Acta Horticulturae*, 877, 1275-1280.

- Niemira, B.A., Gutsol, A., 2010. Nonthermal plasma as a Novel food processing technology. *Nonthermal Processing Technologies for Food*, 1st Edition, 271-288, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK.
- Patocchi, A., Bünter, M., Gerber, A., & Hilber-Bodmer, M., 2009. Erstes Auftreten von *Monilinia fructicola* in einer Schweizer Steinobstanlage. *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau*, 145, 8-11.
- Papavasileiou, A., Testempasis, S., Michailides, T., Karaoglanidis, G., 2015. Frequency of brown rot fungi on blossoms and fruit in stone fruit orchards in Greece. *Plant Pathology*, 64, 416-424.
- Raizer, Y. P. und Allen, J. E., 1997. *Gas discharge physics*, Volume 2, Springer-Verlag Berlin.
- Reddy, M. B., Belkacemi, K., Corcuff, R., Castaigne, F., Arul, J., 2000. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 39-51.
- Schütze, A., Jeong, J. Y., Babayan S. E., Park, J., Selwyn G. S., Hicks, R. F., 1998. The atmospheric pressure plasma jet: A review and comparison to other plasma sources. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 26, 1685-1694.
- Siegfried, W., Viret, O., 2010. Die *Monilinia*-Krankheiten. Merkblatt Nr. 303, Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil, Schweiz, http://www.agroscope.admin.ch/publikationen/07717/index.html?pubkeywords=Monilinia&pubautor=&pubjahrvon=&pubjahrbis=&lang=de&pubsuche=Suchen&flexId=0_0.
- Surowsky, B., Schlüter, O., Knorr, D., 2014a. Interactions of non-thermal atmospheric pressure plasma with solid and liquid food systems: a review. *Food Engineering Reviews*, 7, 82-108.
- Tamm, L., Fluckiger, W., 1993. Influence of temperature and moisture on growth, spore production, and conidial germination of *Monilinia laxa*. *Phytopathology*, 83, 1321-1326.
- Tiede, R., Hirschberg, J., Daeschlein, G., von Woedtke, T., Vioel, W., Emmert, S., 2014. Plasma applications: a dermatological view. *Contributions to Plasma Physics*, 54, 118-130.
- Treutter, D., Wang, D., Farag, M.A., Baires, G.D., Ruhmann, S., Neumuller, M., 2012. Diversity of phenolic profiles in the fruit skin of *Prunus domestica* plums and related species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12011-12019.
- Vandamme, M., Robert, E., Pesnel, S., Barbosa, E., Dozias, S., Sobilo, J., Pouvesle, J. M., 2010. Antitumor effect of plasma treatment on U87 glioma xenografts: preliminary results. *Plasma Processes and Polymers*, 7, 264-273.
- Van Leeuwen, G., Baayen, R., Jeger, M., 2001. Pest risk assessment for the countries of the European Union (as PRA area) on *Monilinia fructicola*. *EPPO Bulletin*, 31, 481-487.
- Villarino, M., Larena, I., Martinez, F., Melgarejo, P., De Cal, A., 2012. Analysis of genetic diversity in *Monilinia fructicola* from the Ebro Valley in Spain using ISSR and RAPD markers. *European journal of plant pathology*, 132, 511-524.

Webinger, J., Keller, D., Budrich, B., 2014. Wie Schreibe Ich Eine Doktorarbeit?: Leitfaden Für Mediziner Und Zahnmediziner. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Deutschland.

Welch, B. L., 1938. The significance of the difference between two means when the population variances are unequal. *Biometrika*, 29, 350-362.

Weltmann, K., Polak, M., Masur, K., von Woedtke, T., Winter, J., Reuter, S., 2012. Plasma processes and plasma sources in medicine. *Contributions to Plasma Physics*, 52, 644-654.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., van Kan, J. A., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561-580.

Wirsel, S.G.R., Leibinger, W., Ernst, M., Mendgen, K., 2001. Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist*, 149, 589-598.

5 Anhang



Abbildung 42. 5-minütige Plasmabehandlung von *M. laxa* auf Zwetschge.

Die obere Reihe zeigt Früchte, welche 5 Minuten mit Plasma behandelt wurden, die Früchte der unteren Reihe sind unbehandelte Kontrollfrüchte. Die Aufnahmen wurden 4 Tage nach der Plasmabehandlung gemacht.



Abbildung 43. 10-minütige Plasmabehandlung von *M. laxa* auf Zwetschge.

Die obere Reihe zeigt Früchte, welche 10 Minuten mit Plasma behandelt wurden, die Früchte der unteren Reihe sind unbehandelte Kontrollfrüchte. Die Aufnahmen wurden 4 Tage nach der Plasmabehandlung gemacht.

