

**UNTERSUCHUNGEN ZUM DRUCKWECHSELVERFAHREN ALS
SCHONENDE METHODE ZUR ENTKEIMUNG FLÜSSIGER
ARZNEISTOFFZUBEREITUNGEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Enrico Hanusa

Hamburg 2009

Gutachter: Prof. Dr. C. S. Leopold
Prof. Dr. B. Bisping

Tag der Disputation: 28. August 2009

Die Kenner, wenn sie etwa eine Zeichnung sehen,
gehen von Dürer oder Rembrandt oder von Picasso aus;
der Schaffende, gleichviel wo er selber wirkt,
weiß um das leere Papier.

- Max Frisch -

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von
Frau Professor Dr. rer. nat. Claudia S. Leopold

in der Pharmazeutischen Technologie des Institutes für Pharmazie an der Universität Leipzig sowie in der Abteilung Pharmazeutische Technologie des Institutes für Pharmazie an der Universität Hamburg im Rahmen des BMBF-Projektes Wachstumskern IKON.

Meiner Doktormutter und Mentorin, Frau Professor Dr. rer. nat. Claudia S. Leopold, möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreichen Anregungen und konstruktiven Diskussionen bei der Realisierung der Arbeit sowie das jederzeit entgegengebrachte Vertrauen danken. Die mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung der Problematik und das familiäre Arbeitsklima trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Frau Klingner von der edecto GmbH möchte ich für die Überlassung des Hochdruckautoklaven danken, ohne den die Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre. Darüber hinaus danke ich ihr für die stets gewährte freundliche Unterstützung.

Danken möchte ich außerdem Herrn Dr. Wecks vom Institut für Nichtklassische Chemie an der Universität Leipzig, Frau Dr. Bönsch vom Sächsischen Institut für Angewandte Biotechnologie e.V. an der Universität Leipzig und Frau Dr. Dengl vom Pharmazeutischen Institut der Universität Leipzig für die gute Zusammenarbeit während und nach Abschluss des BMBF-Projekts.

Frau Walter und Herrn Dr. Keyser vom Institut für Zoologie der Universität Hamburg möchte ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der REM-Aufnahmen danken. Für die Hilfe bei der Erstellung der CD-Spektren möchte ich Frau Heffter vom Institut für Angewandte und Anorganische Chemie der Universität Hamburg danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Radmacher und Herrn Doschke vom Institut für Biophysik der Universität Bremen für ihr umfangreiches Engagement bei der Aufnahme und Auswertung der Rasterkraftkurven.

Der Lilly Deutschland GmbH danke ich für die kostenlose Bereitstellung des Humaninsulins.

Den ständigen Mitarbeitern der pharmazeutisch-technologischen Abteilungen in Leipzig und Hamburg, Dr. Ulrike Opitz, Petra Borbe, Dr. Albrecht Sakmann, Ursula Fehér, Hannelore Kratz, Richard Friedrich und Gerda Dammer danke ich für die jederzeit gute Zusammenarbeit und das freundliche Miteinander.

Meinen Kondoktoranden, allen voran Robert Conradi und Steffi Jäger, danke ich für die schöne Zeit, auch über den universitären Alltag hinaus.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und Geduld während der gesamten Zeit. Vor allem möchte ich mich bei Jenny bedanken, die mir besonders in der Zeit des Zusammenschreibens unermüdlich zur Seite stand.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	1
2	MIKROORGANISMEN	4
2.1	EINLEITUNG	4
2.1.1	BAKTERIEN	5
2.1.1.1	MORPHOLOGISCHE EINTEILUNG	5
2.1.1.2	ZELLSTRUKTUR	5
2.1.2	PILZE	7
2.2	MATERIALIEN UND METHODEN	9
2.2.1	MATERIALIEN	9
2.2.1.1	MIKROORGANISMENKULTUREN	9
2.2.1.2	NÄHRMEDIEN	9
2.2.1.3	FARBSTOFFE FÜR DIE LICHT- UND FLUORESCENZMIKROSKOPIE	9
2.2.1.4	TRÄGERMATERIALIEN UND PUFFER FÜR DIE RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	9
2.2.2	METHODEN	10
2.2.2.1	MORPHOLOGISCHE UND PHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MIKROORGANISMEN	10
2.2.2.2	STAMMHALTUNG	12
2.2.2.3	WACHSTUMSBEDINGUNGEN	12
2.2.2.4	TRÜBUNGSMESSUNG	13
2.2.2.5	KEIMZAHLBESTIMMUNG	13
2.2.2.6	ZELLFÄRBUNG	14
2.2.2.7	MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG (LICHTMIKROSKOPIE, REM)	14
2.2.2.8	BESTIMMUNG DER GRÖßENVERTEILUNG (MIKROSKOPIE, LASER-DIFFRAKTOMETRIE)	15
2.2.2.9	DYNAMISCHE DIFFERENZKALORIMETRIE (DSC)	17
2.2.2.10	RASTERKRAFTMIKROSKOPIE (AFM)	18
2.3	ERGEBNISSE	24
2.3.1	VALIDIERUNG DER ANZUCHTBEDINGUNGEN	24
2.3.1.1	GRAMPOSITIVE BAKTERIEN	24
2.3.1.2	GRAMNEGATIVE BAKTERIEN	30
2.3.1.3	PILZE	32
2.3.2	BESTIMMUNG DER ZELLGRÖßE	35

2.3.2.1	MIKROSKOPISCHE GRÖßENBESTIMMUNG	35
2.3.2.1.1	STÄBCHENFÖRMIGE MIKROORGANISMEN	35
2.3.2.1.2	KUGELFÖRMIGE MIKOORGANISMEN	39
2.3.2.2	LASERDIFFRAKTOMETRIE	41
2.3.3	THERMISCHE EIGENSCHAFTEN VON ZELLBESTANDTEILEN (DSC)	44
2.3.4	MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN VON MIKROORGANISMENZELLEN (AFM)	46
3	ENTKEIMUNGSVERFAHREN	56
3.1	EINLEITUNG	56
3.2	METHODEN DES EUROPÄISCHEN ARZNEIBUCHES ZUR ENTKEIMUNG PHARMAZEUTISCHER ZUBEREITUNGEN	58
3.2.1	DAMPFSTERILISATION	58
3.2.2	STERILISATION DURCH TROCKENE HITZE	59
3.2.3	STRAHLENSTERILISATION	60
3.2.4	GASSTERILISATION	61
3.2.5	FILTRATION	62
3.3	ALTERNATIVE ENTKEIMUNGSVERFAHREN	63
3.3.1	HOCHDRUCKENTKEIMUNG	63
3.3.2	ENTKEIMUNG MIT ÜBERKRITISCHEM CO ₂	65
3.3.3	ULTRASCHALLENTKEIMUNG	66
3.3.4	GEPULSTE ELEKTRISCHE FELDER	68
3.3.5	ULTRAKURZE LICHTBLITZE	69
4	ENTKEIMUNGSVERSUCHE MIT DEM DRUCKWECHSELVERFAHREN	70
4.1	EINLEITUNG	70
4.1.1	GASLÖSLICHKEIT	71
4.1.2	GASDIFFUSION	73
4.2	MATERIALIEN UND METHODEN	74
4.2.1	MATERIALIEN	74
4.2.1.1	MIKROORGANISMENKULTUREN	74
4.2.1.2	NÄHRMEDIEN	74

4.2.2	METHODEN	74
4.2.2.1	AUFBAU DER VERWENDETEN DRUCKWECHSELAUTOKLAVEN	74
4.2.2.2	HERSTELLUNG UND BEHANDLUNG DER PROBEN	76
4.2.2.3	ASEPTISCHE VERSUCHSFÜHRUNG	76
4.2.2.4	STAMMHALTUNG UND WACHSTUMSBEDINGUNGEN	77
4.2.2.5	MIKROSKOPISCHE VERFAHREN	77
4.2.2.6	KEIMZAHLBESTIMMUNG NACH LIVE/DEAD-FÄRBUNG	77
4.2.2.7	DYNAMISCHE DIFFERENZKALORIMETRIE	79
4.2.2.8	VIKOSITÄTSMESSUNG	79
4.3	ERGEBNISSE	81
4.3.1	PROZESSGAS STICKSTOFF	81
4.3.1.1	ABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES VON DER ART DER MIKROORGANISMEN	85
4.3.1.1.1	GRAMPOSITIVE BAKTERIEN	85
4.3.1.1.2	GRAMNEGATIVE BAKTERIEN	92
4.3.1.1.3	PILZE	95
4.3.1.1.4	ZUSAMMENFASSUNG	98
4.3.1.2	ABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES VON DER GELÖSTGASMENGE	99
4.3.1.3	TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGS	100
4.3.1.4	EINFLUSS DER AUSGANGSKEIMZAHL	103
4.3.1.5	EINFLUSS DES ZELLALTERS	105
4.3.1.6	EINFLUSS DER DRUCKHALTEZEIT	108
4.3.1.7	EINFLUSS DES ENTSPANNUNGSVOLUMENS UND DER ENTSPANNUNGS-HÄUFIGKEIT	109
4.3.1.8	MODIFIZIERUNG DER FLUIDITÄT VON ZELLMEMBRANEN AN AUSGEWÄHLTEN MIKROORGANISMEN	111
4.3.1.9	EINFLUSS DES EINGESETZTEN PROBENVOLUMENS	114
4.3.1.10	EINFLUSS DER VISKOSITÄT DES MEDIUMS	116
4.3.1.11	ZERSTÖRUNG INAKTIVIERTER MIKROORGANISMEN	119
4.3.2	PROZESSGAS DISTICKSTOFFOXID	120
4.3.2.1	ABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES VON DER ART DER MIKROORGANISMEN	124
4.3.2.1.1	GRAMPOSITIVE BAKTERIEN	124
4.3.2.1.2	GRAMNEGATIVE BAKTERIEN	131

4.3.2.1.3	PILZE	133
4.3.2.1.4	ZUSAMMENFASSUNG	135
4.3.2.2	ABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES VON DER GELÖSTGASMENGE	136
4.3.2.3	TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES	138
4.3.2.4	EINFLUSS DER AUSGANGSKEIMZAHL	140
4.3.3	PROZESSGAS STICKSTOFF/DISTICKSTOFFMONOXID	142
4.3.4	REM-UNTERSUCHUNGEN DRUCKWECHSELBEHANDELTER MIKROORGANISMEN	144
4.3.4.1	<i>BACILLUS ATROPHEUS</i>	145
4.3.4.2	<i>BREVUNDIMONAS DIMINUTA</i>	147
4.3.4.3	<i>CANDIDA ALBICANS</i>	148
4.3.4.4	REINES NÄHRMEDIUM	149
4.3.5	DSC-UNTERSUCHUNGEN DRUCKWECHSELBEHANDELTER MIKROORGANISMEN	149
5	WIRKSTOFFSTABILITÄT	154
5.1	EINLEITUNG	154
5.1.1	L-EPINEPHRIN (ADRENALIN)	154
5.1.2	D-PENICILLAMIN	156
5.1.3	PHYSOSTIGMIN (ESERIN)	157
5.1.4	PARAOXON	157
5.1.5	HUMANINSULIN	158
5.2	MATERIALIEN UND METHODEN	160
5.2.1	MATERIALIEN	160
5.2.1.1	WIRKSTOFFE	160
5.2.1.2	PUFFER	160
5.2.1.3	STERILFILTRATION	160
5.2.1.4	VERPACKUNGSMATERIAL	160
5.2.2	METHODEN	161
5.2.2.1	HERSTELLUNG UND BEHANDLUNG DER PROBEN	161
5.2.2.1.1	KURZZEITSTABILITÄT VON L-EPINEPHRIN, D-PENICILLAMIN, PHYSOSTIGMIN UND PARAOXON	161
5.2.2.1.2	KURZZEITSTABILITÄT VON HUMANINSULIN	163
5.2.2.1.3	BESCHLEUNIGTER HALTBARKEITSTEST	164

5.2.2.2	L-EPINEPHRIN-, D-PENICILLAMIN- UND PHYSOSTIGMIN-ANALYTIK (HPLC)	165
5.2.2.3	PARAOXON-ANALYTIK (HPLC)	167
5.2.2.4	INSULIN-ANALYTIK (HPLC, UV/VIS, ZIRKULARDICHROISMUS)	168
5.3	ERGEBNISSE	170
5.3.1	L-EPINEPHRINHYDROGENTARTRAT	170
5.3.1.1	KURZZEITSTABILITÄT	170
5.3.1.2	BESCHLEUNIGTER HALTBARKEITSTEST	174
5.3.2	D-PENICILLAMIN	177
5.3.3	PHYSOSTIGMINHEMISALICYLAT	181
5.3.4	PARAOXON	185
5.3.5	HUMANINSULIN	188
6	ZUSAMMENFASSUNG	194
7	SUMMARY	198
	ANHANG: TEMPERATUR- UND DRUCKVERLAUF IM DRUCKWECHSELPROZESS	201
	PROZESSGAS STICKSTOFF	201
	PROZESSGAS DISTICKSTOFFMONOXID	210
	PROZESSGAS STICKSTOFF/DISTICKSTOFFMONOXID	214
	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	214
	DSC-UNTERSUCHUNGEN	215
	LITERATURVERZEICHNIS	216
	GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS	234
	BEZUGSQUELLENNACHWEIS	235
	LEBENS LAUF	237

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Fläche
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskopie
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ATTC	American Type Culture Collection
<i>B. atropheus</i>	<i>Bacillus atropheus</i>
<i>B. diminuta</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
BioStoffV	Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen
ca.	cirka
°C	Grad Celsius
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
cm	Zentimeter
<i>C. sporogenes</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>
d	Durchmesser
DAC/NRF	Deutscher Arzneimittel Codex/Neues Rezeptur Formularium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DWV	Druckwechselverfahren
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii
EG	Europäische Gemeinschaft
E-Modul	Young'sches Elastizitätsmodul
g	Gramm
Gl.	Gleichung
<i>G. stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
h	Stunde

I.E.	Internationale Einheit
K	Kelvin
k_H	Henry'scher Koeffizient
Kap.	Kapitel
KBE	Koloniebildendeinheit
L	Ostwald'scher Löslichkeitskoeffizient
l	Liter
m	gewogenes arithmetisches Mittel
max.	maximal
<i>M. gryphiswaldense</i>	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>
<i>M. hungatei</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i>
min	Minute
n	Anzahl der Versuchwiederholungen
N	Newton
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
p	Druck
Pa	Pascal
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH	Wasserstoffionenexponent
Ph.Eur.	Pharmacopoeia Europea
r	Radius
R	allgemeine Gaskonstante
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAL	Sterility Assurance Level
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tab.	Tabelle
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volumen
\bar{x}	arithmetisches Mittel

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Zahl der auf der Erde lebenden Prokaryoten beträgt ca. $4\text{-}6 \cdot 10^{30}$. Mit $350\text{-}550 \cdot 10^9$ Tonnen entfällt schätzungsweise die Hälfte des durch lebende Organismen gebundenen Kohlenstoffs auf sie [1]. Prokaryoten sind ein unverzichtbarer Bestandteil des globalen Ökosystems; sie katalysieren eine Vielzahl von Umwandlungsprozessen, sind maßgeblich an der Zusammensetzung der Erdatmosphäre beteiligt und repräsentieren einen großen Teil der genetischen Vielfalt des Lebens auf der Erde. Für den Menschen können sie sowohl nützliche als auch schädliche Auswirkungen haben; entscheidend ist jeweils die Art der Interaktion. Ihre Anwesenheit in Arzneistoffzubereitungen ist jedoch bis auf wenige Ausnahmen unerwünscht und kann je nach Mikroorganismenart eine Gesundheitsgefährdung für den Patienten darstellen. Die Keimfreiheit bzw. Keimarmut vieler Arzneistoffzubereitungen ist daher unerlässlich. Besonders bei parenteral zu verabreichenden Zubereitungen ist die Keimfreiheit zwingend erforderlich, da hierbei viele der natürlichen Schutzmechanismen gegen das Eindringen von Krankheitserregern in den menschlichen Organismus umgangen werden.

Das Europäische Arzneibuch definiert den Begriff der Sterilität als „Abwesenheit von lebensfähigen Mikroorganismen“. Daraus ergibt sich ein hoher Anspruch an jedes Sterilisationsverfahren. Dem absoluten Begriff der Sterilität wohnt dabei immer die Gefahr inne, das praktische Ziel der Infektionsvermeidung aus den Augen zu verlieren; auch ist die Prüfbarkeit eines solchen Absolutzustandes praktisch nicht möglich. Die Wirkungsmechanismen aller Sterilisationsverfahren beruhen auf einer irreversiblen Veränderung biochemischer Komponenten mit nachfolgender Auswirkung auf die Integrität, den Metabolismus und die Reproduktion der Mikroorganismenzellen. Die erforderlichen physikalischen oder chemischen Maßnahmen lassen sich jedoch nicht auf die gewünschten antimikrobiellen Effekte beschränken, so dass auch immer die Materialeigenschaften und die Funktionalität der Sterilisationsgüter ungünstig beeinflusst werden können [2]. Die Konsequenz ist, dass es kein universelles Sterilisationsverfahren gibt und daher für jedes Sterilisationsgut das angemessene Verfahren ausgewählt und gegebenenfalls angepasst werden muss. Die Entwicklung neuer, innovativer und hinsichtlich ihrer Stabilität meist sehr empfindlicher Arzneistoffe, für deren Anwendung die Sterilität häufig eine unbedingte Voraussetzung ist, zeigt die Grenzen der etablierten Sterilisationsverfahren auf und begründet damit gleichzeitig die Forderung nach Alternativen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung des Druckwechselerfahrens zu einer Technologie für die sichere Entkeimung von flüssigen pharmazeutischen Zubereitungen bei gleichzeitigem Erhalt der häufig thermolabilen Wirkstoffe. Damit soll eine nichtthermische Alternative zur klassischen Hitzesterilisation geschaffen werden. Das Druckwechselerverfahren besteht aus drei Teilprozessen. Zunächst wird Gas unter Druck im flüssigen, zu entkeimenden Produkt gelöst. Die sich anschließende Druckhaltezeit von einigen Minuten bis wenigen Stunden soll die vollständige Ausbildung des Lösungsgleichgewichts zwischen Gasphase, flüssigem Gut und den darin enthaltenen Mikroorganismen sicherstellen. Der abschließende schnelle Druckwechsel durch Entspannung auf Atmosphärendruck führt zur spontanen Freisetzung des unter Druck gelösten Gases. Dieser Prozess umfasst sowohl das im flüssigen Medium gelöste Gas als auch die in die Mikroorganismenzellen eindiffundierte Gasmenge. Wird der Entspannungsprozess sehr schnell durchgeführt, entsteht im Inneren der Mikroorganismenzellen ein Überdruck, der nicht mehr durch Rückdiffusion des Gases durch die Zellwand abgebaut werden kann. Die Zellen zerplatzen, wenn der im Zellinneren entstandene Druck die Reißfestigkeit der Mikroorganismenhülle überschreitet.

Da die Abtötung der Mikroorganismen und der Erhalt der Wirkstoffe gegenläufige Parameterabhängigkeiten erwarten lassen, ist die Bestimmung geeigneter Prozessfenster zur Erreichung aller Anforderungen unerlässlich. Während für eine sichere Abtötung der Mikroorganismen möglichst hohe Gaslöslichkeiten und hohe Differenzdrücke bei der abschließenden Entspannung benötigt werden, steigt mit dem Druck auch die chemische Empfindlichkeit der Wirkstoffe. Im Rahmen dieser Arbeit werden Stickstoff, Distickstoffoxid sowie Mischungen aus beiden Gasen hinsichtlich ihrer Effektivität auf die Keimabtötung und ihres Einflusses auf die chemische Stabilität der Inhaltsstoffe untersucht. Daneben ist der Einfluss der Gelöstgasmenge und damit verbunden des Druckes, der Druckhaltezeit, des Temperaturregimes und der Entspannungsmethodik zu definieren.

Der Nachweis der Wirksamkeit des Druckwechselerfahrens soll anhand von verschiedenen Modell-Mikroorganismen erbracht werden. Dazu werden verschiedene Vertreter grampositiver und gramnegativer Bakterien sowie zwei Pilzarten dem Druckwechselprozess unterzogen und deren Überlebensrate bzw. die Reduktionsrate bestimmt. Zum besseren Verständnis des genauen Abtötungsmechanismus und um vorhandene Abhängigkeiten zwischen der Effektivität des Entkeimungsverfahrens und den physiologischen und morphologischen Eigenschaften der Mikroorganismenzellen zu erkennen, werden darüber hinaus die verwendeten Kulturen mithilfe verschiedener

analytischer Verfahren, wie der Differenzkalorimetrie und der Rasterkraftmikroskopie, charakterisiert.

Da neben der Effektivität des Entkeimungsverfahrens auf das Absterbeverhalten von Mikroorganismen der Einfluss des Verfahrens auf das zu entkeimende Gut dessen Anwendbarkeit entscheidend mitbestimmt, ist die Stabilität verschiedener Wirkstoffe im Druckwechselprozess zu untersuchen. Bei den ausgewählten Substanzen handelt es sich um die thermolabilen und hydrolyse- bzw. oxidationsempfindlichen Wirkstoffe L-Epinephrin, Paraoxon, D-Penicillamin und Physostigmin. Der zunehmenden Verbreitung hochmolekularer Biologicals in der Arzneimitteltherapie soll ebenfalls Rechnung getragen werden. Hierzu wird das druck- und temperaturempfindliche Humaninsulin als Vertreter dieser Gruppe ebenfalls dem Druckwechselprozess und anschließenden Stabilitätsbetrachtungen unterzogen.

2 MIKROORGANISMEN

2.1 EINLEITUNG

Die erfolgreiche Abtötung von Mikroorganismen setzt eine genaue Kenntnis der morphologischen und physiologischen Gegebenheiten der Zellen voraus. In der pharmazeutischen Praxis sind vor allem Bakterien und Pilze sowie deren Dauerformen als potentielle Kontaminanten von Arzneizubereitungen von Interesse [3]. Die Auswahl der in der vorliegenden Arbeit betrachteten Mikroorganismen erfolgte daher in Anlehnung an die in den Kapiteln „Prüfung auf Sterilität“ und „Methoden zur Herstellung steriler Zubereitungen“ des Europäischen Arzneibuches empfohlenen Testkeime [4].

Die eingesetzten Mikroorganismen wurden zunächst hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens in CASO-Bouillon durch turbidimetrische Messungen der Flüssigkulturen in Kombination mit der Lebendkeimzahlbestimmung durch Ausspateln auf Agar-Platten charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurden auch verschiedene Nährböden hinsichtlich ihrer Eignung zur Anzucht der unterschiedlichen Mikroorganismen getestet. Ziel dabei war es, sicherzustellen, dass durch optimale Nährstoffversorgung auch die Detektion geschwächter oder geschädigter aber noch lebensfähiger Zellen gewährleistet ist. Für eine spätere Betrachtung von Gasdiffusionsprozessen während der Druckwechselbehandlung waren vor allem Zellgröße, Zellform und Zellaufbau von Interesse. Die Bestimmung der Zellgröße erfolgte licht- und elektronenmikroskopisch durch das Ausmessen von Einzelobjekten im mikroskopischen Bild und durch Laserlichtbeugung an Teilpopulationen. Zellform und -aufbau waren bekannt und bedurften daher keiner weiteren Bestimmung.

Von besonderer Bedeutung war die Charakterisierung der eingesetzten Mikroorganismen hinsichtlich ihrer thermischen und mechanischen Eigenschaften, um eine Bewertungsbasis für Druck- und Temperatureffekte während der Druckwechselbehandlung zu schaffen. Zur thermischen Analyse fand die dynamische Differenzkalorimetrie Anwendung. Im Mittelpunkt stand dabei die Temperaturbestimmung der irreversiblen Denaturierung verschiedener essentieller Proteine [5]. Die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Bakterienzelle, insbesondere des Elastizitätsmoduls der Zellwand sowie deren Bruch- bzw. Reißfestigkeit, erfolgte durch rasterkraftmikroskopische Messungen an intakten, lebenden Zellen [6].

2.1.1 BAKTERIEN

2.1.1.1 MORPHOLOGISCHE EINTEILUNG

Bakterien sind einzellige Mikroorganismen, die nur in seltenen Fällen in differenzierten Zellverbänden leben [7]. Die meisten Bakterien sind zwischen 0,1 und 30 μm groß, wobei kleinere Formen bevorzugt sind [8]. Zum einen haben diese ein günstigeres Oberfläche/Volumen-Verhältnis und damit kürzere Diffusionswege für Nährstoffe und Stoffwechselprodukte, was eine höhere Stoffwechselrate ermöglicht. Zum anderen können bei äquivalentem Nährstoffangebot kleinere Mikroorganismenzellen eine größere Population erzeugen. Daraus ergibt sich eine größere Anzahl an zufällig günstigen Mutationen; dies wiederum ermöglicht eine bessere Adaptation an die vorherrschenden Umweltbedingungen [9].

Morphologisch lassen sich Bakterien in kugelige Formen (Kokken), stäbchenartige Formen und gekrümmte bzw. gewundene Formen unterteilen [10]. Ein wichtiges Merkmal der Bakterien ist ihr Verhalten bei der Gramfärbung, wobei man zwischen grampositiven und gramnegativen Spezies unterscheidet (vgl. Kap. 2.2.2.6). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Fähigkeit zur Sporenbildung. Einige Bakterienarten sind zur Bildung von Endosporen befähigt. Dabei handelt es sich um Dauerformen, die der Arterhaltung bei ungünstigen Umweltbedingungen dienen. Besonders kritisch aus Sicht der Arzneimittelsicherheit ist in diesem Zusammenhang die hohe Resistenz der Sporen gegenüber Hitze, Strahlung und Desinfektionsmitteln. Aus diesem Grund wird die Effektivität der meisten Sterilisationsverfahren an Endosporen und nicht an vegetativen Zellen bestimmt.

2.1.1.2 ZELLSTRUKTUR

Bakterien besitzen eine Cytoplasmamembran und bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Mykoplasmen) eine darüber gelagerte Zellwand. Die Cytoplasmamembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht und darin eingebetteten Membranproteinen (Abb. 1 und 2). Diese Biomembran stellt die Diffusionsbarriere der Bakterienzelle dar und ist somit unter anderem für die Regulation des Zellinnendrucks (Turgor) verantwortlich [11]. Durch äußere Einflüsse verursachter osmotischer Stress kann durch verschiedene Mechanismen ausgeglichen werden. Viele Mikroorganismen sind durch mechanosensitive Kanäle in der Lage, auf einen starken intrazellulären Druckanstieg, z.B. als Folge einer stark hypotonen Umgebung, zu reagieren. Dabei werden die mechanosensitiven Kanäle geöffnet; dies führt zu einem Ausströmen von Cytoplasma und somit zu einer Reduzierung des Zellinnen-

drucks [12]. Die Anreicherung von osmoprotektiven Substanzen, wie z.B. Prolin, im Zellinneren kann dagegen das Überleben der Zelle in einer stark hypertonen Umgebung sichern [13]. Die antimikrobielle Wirkung konzentrierter Zuckerlösungen ist demnach weniger vom osmotischen Druck der Zuckerlösung abhängig, als vielmehr von deren Wasseraktivität (a_w -Wert) und damit vom Grad des verfügbaren „freien“ Wassers [14]. Im Gegensatz zur eukaryotischen Cytoplasmamembran finden sich in der Lipiddoppelschicht keine Sterole zur Stabilisierung. Einige Prokaryoten weisen zwar auch Triterpene (Hopanoide) auf; insgesamt ist jedoch die Rigidität der Cytoplasmamembran deutlich geringer.

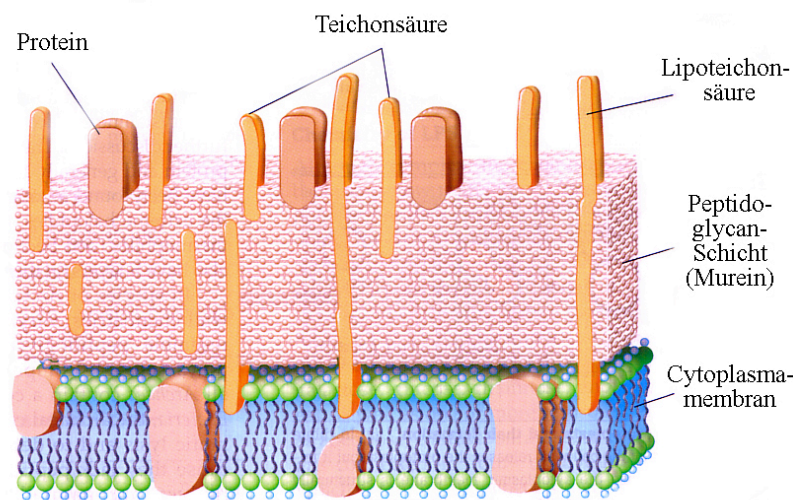


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zellwand-Gesamtstruktur grampositiver Bakterien; Abb. modifiziert nach [9]

Die Zellwand besitzt, ebenso wie die Cytoplasmamembran, sehr unterschiedliche Funktionen. Besonders hervorzuheben sind dabei die Stabilisierung des Zellinnendrucks, der Schutz vor mechanischen Beschädigungen von außen sowie die Formgebung der Bakterienzelle [11, 15]. Jede Bakterienzellwand besteht aus einer Stützschiicht und einer darauf aufliegenden plastischen Schicht, die eng miteinander verzahnt sind [16]. Die Stützschiicht wird von einem aus Muraminsäure und N-Acetyl-Glucosamin zusammengesetzten Peptidoglycan gebildet. Grampositive Zellen weisen im Vergleich zu gramnegativen Zellen eine wesentlich stärker ausgebildete Peptidoglycanschicht auf (Abb. 1 und 2). Je nach Bakterienart setzt sich die plastische Schicht aus verschiedenen hochmolekularen Verbindungen zusammen. Bei grampositiven Bakterien sind das hauptsächlich Teichonsäurederivate, deren Phosphat- und Carboxylgruppen für die negative Ladung der Bakterienoberfläche verantwortlich sind [17].

Die äußere Membran gramnegativer Bakterien besteht aus Phospholipiden, Proteinen und Lipopolysacchariden. Im Vergleich zur Cytoplasmamembran ist diese Lipiddoppelschicht der äußeren Membran aufgrund vorhandener Porine für kleinere Moleküle gut permeabel (Abb. 2). Die bei lebenden gramnegativen Bakterien zellulär gebundenen Lipopolysaccharide werden nach deren Tod als Endotoxine freigesetzt. Die toxische Wirkung der thermostabilen Endotoxine geht dabei von der Lipid A-Teilstruktur aus [18].

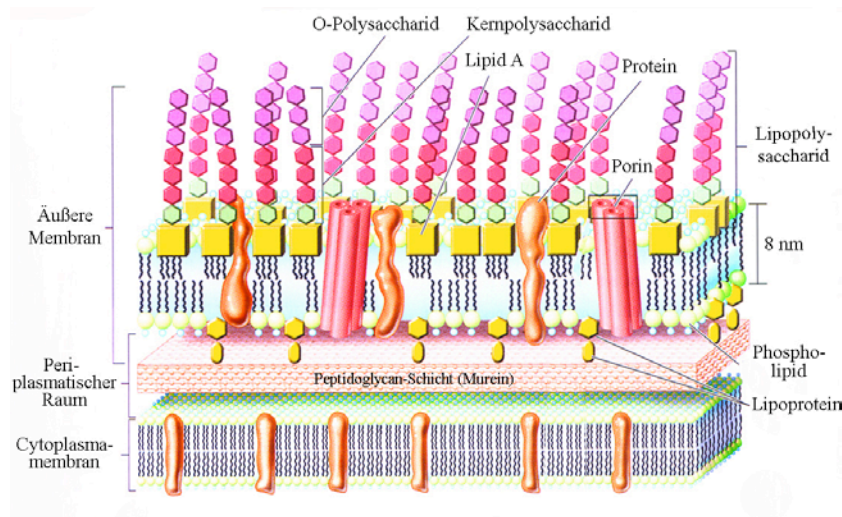


Abb. 2: Schematische Darstellung der Zellwand-Gesamtstruktur gramnegativer Bakterien; Abb. modifiziert nach [9]

Neueren Erkenntnissen zufolge sind neben der Zellwand noch weitere zelluläre Strukturen an der Formgebung, Stabilisierung und an den Teilungsprozessen der Bakterienzelle beteiligt. So konnten für die wichtigsten Cytoskelettproteine eukaryotischer Zellen - Actin, Tubulin und Intermediärfilamente - Homologe im bakteriellen Cytoskelett nachgewiesen werden [19-21]. Die von Koch in den 1980er Jahren postulierte Surface Stress Theory, nach der das Zusammenspiel von Turgor und lokalem Zellwandwachstum zum Gesamtzellwachstum führt, konnte durch den Nachweis eines bakteriellen Cytoskeletts in Teilen bestätigt bzw. ergänzt werden [20, 22-24].

2.1.2 PILZE

Pilze sind phylogenetisch den Eukaryoten zugeordnet. Neben einem echten Zellkern weisen sie im Vergleich zu den Bakterien ein durch Biomembranen kompartimentiertes Cytoplasma und Zellorganellen auf [25]. Die Zellwand von Pilzen besteht zu 90 % aus Polysacchariden (Chitin, Cellulose); daneben sind auch Proteine und Fette am Aufbau beteiligt [9]. Aus rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass diese Zusammensetzung ein im Vergleich zur Bakterienzellwand deutlich größeres Elastizitäts-

modul und damit verbunden eine höhere Steifigkeit der Zelle zur Folge hat [26]. Inwieweit diese höhere Steifigkeit einen Schutz der Zellen vor mechanischer Belastung darstellt, wurde in eigenen rasterkraftmikroskopischen Experimenten an *A. niger*-Zellen untersucht.

2.2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.2.1 MATERIALIEN

2.2.1.1 MIKROORGANISMENKULTUREN

<i>Bacillus atropheus</i>	DSM 675 (ATCC 9372)
<i>Bacillus pumilus</i>	DSM 492 (ATCC 27142)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	DSM 5934 (ATCC 7953)
<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i>	DSM 799 (ATCC 6538)
<i>Clostridium sporogenes</i>	DSM 1664 (ATCC 19404)
<i>Brevundimonas diminuta</i>	DSM 1635 (ATCC 19146)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1128 (ATCC 9027)
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 1988 (ATCC 16404)
<i>Candida albicans</i>	DSM 1386 (ATCC 10231)

2.2.1.2 NÄHRMEDIEN

CASO-Agar

CASO-Bouillon

Fleisch-Leber-Agar

Malzextrakt-Agar

Pseudomonas-Agar P

R2A-Agar

Thioglycolat-Bouillon

2.2.1.3 FARBSTOFFE FÜR DIE LICHT- UND FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Gramfärbung: Kristallviolettlösung

Lugolsche Lösung

Safraninlösung

Vitalfärbung: Propidiumiodid

SYTO[®] 9 green

2.2.1.4 TRÄGERMATERIALIEN UND PUFFER FÜR DIE RASTERKRAFTMIKROSKOPIE

Trägermaterialien: Glimmer (Muskovit)

Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (StarFrost[®]-Adhäsiv-Polycat)

silanierte Objektträger (StarFrost[®]-Adhäsiv)

Puffer: HEPES-Puffer	0,5 ml HEPES-Puffer pH 7,0 (1 mol/l) 0,584 g Natriumchlorid R in 1.000 ml Wasser R
PBS-Puffer pH 7,4	8,0 g Natriumchlorid R 0,2 g Kaliumchlorid R 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat R 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat R in 1.000 ml Wasser R pH-Einstellung mit 0,1 mol/l Salzsäure
Phosphatpuffer Sørensen pH 7,0	7,26 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat R 3,52 g Kaliumdihydrogenphosphat R in 1.000 ml Wasser R

2.2.2 METHODEN

2.2.2.1 MORPHOLOGISCHE UND PHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MIKROORGANISMEN

Eine Übersicht der wichtigsten Eigenschaften der eingesetzten Mikroorganismen ist Tab. 1 zu entnehmen. Die ausgewählten Spezies stellen ein sehr breites Spektrum hinsichtlich ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften dar. Neben den verschiedenen Prokaryoten wurden auch zwei Vertreter der Eukaryoten im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrachtet. So konnte sichergestellt werden, dass Mikroorganismen mit sehr unterschiedlichen mechanischen und stoffwechselphysiologischen Eigenschaften bei der Bewertung des Druckwechselprozesses Berücksichtigung finden. Eine möglichst hohe Variabilität der Zellwandstrukturen, als Zielstrukturen für mechanische Beschädigungen bzw. Zerstörungen durch den Druckwechselprozess, war dabei von besonderem Interesse.

Tab. 1: Morphologische und physiologische Charakterisierung der eingesetzten Mikroorganismen [9, 27, 28]

	<i>B. atrophaeus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>G. stearo-thermophilus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>B. diminuta</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
Domäne	Bakteria	Bakteria	Bakteria	Bakteria	Bakteria	Bakteria	Bakteria	Eukarya	Eukarya
Gramverhalten	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	-	-
Form	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Kokken	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Myzel	kugelig
Sporenbildung	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Begeißelung	peritrich	peritrich	peritrich	-	peritrich	monopolar monotrich	monopolar monotrich	-	-
O₂-Bedarf	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	obligat anaerob	obligat aerob	obligat aerob	fakultativ aerob	fakultativ aerob
Energiegewinnung	Atmung/Gärung	Atmung/Gärung	Atmung/Gärung	Atmung/Gärung	Gärung	Atmung	Atmung	Atmung	Atmung/Gärung
Inkubationstemperatur [°C]	35	30	50	30	37	30	30	30	30
Nährmedium	CASO-Bouillon	CASO-Bouillon	CASO-Bouillon	CASO-Bouillon	Thioglycolat-Bouillon	CASO-Bouillon	CASO-Bouillon	CASO-Bouillon	CASO-Bouillon
Risikogruppe*	I	I	I	II	II	II	II	I	II

* § 4 Abs. 1 der BioStoffV regelt in Verbindung mit dem Anhang III der Richtlinie 2000/54/EG die Einstufung von biologischen Arbeitsstoffen in 4 Risikogruppen.

2.2.2.2 STAMMHALTUNG

Alle Stammkulturen mit Ausnahme der *C. sporogenes*-Kultur wurden auf Schrägagar (CASO-Agar) angelegt, bebrütet und im Anschluss im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt. Im Abstand von 6-8 Wochen erfolgte das Überimpfen auf frisches Medium. Um eine Selektion von Stämmen mit veränderten Eigenschaften zu verhindern bzw. um ihre unveränderte Identität zu gewährleisten, wurde jede Stammkultur nach Aktivierung der gefriergetrockneten Stammkultur nur fünfmal überimpft und spätestens 8 Wochen nach dem letzten Überimpfen vollständig durch Dampfsterilisation vernichtet. Die Anzucht und Aufbewahrung der *C. sporogenes*-Kulturen erfolgte auf Fleisch-Leber-Agar im Anaerobentopf. Anaerocult® C (Merck, Darmstadt) wurde zur Erzeugung der sauerstoffabgereicherten Atmosphäre eingesetzt. Um eine aufwendige Stammhaltung zu vermeiden, wurde die von der DSMZ bezogene gefriergetrocknete Stammkultur direkt nach der Aktivierung als Arbeitskulturen eingesetzt, die entsprechenden Versuche innerhalb von 6 Wochen durchgeführt und im Anschluss die gesamte Kultur vernichtet.

2.2.2.3 WACHSTUMSBEDINGUNGEN

Die Anzucht der Mikroorganismen in flüssigem Nährmedium erfolgte in zu 30 % gefüllten Erlenmeyerkolben im Klimaschrank. Das sterile Nährmedium wurde mit der jeweiligen Stammkultur unter aseptischen Bedingungen angeimpft und auf einem Rundschüttler (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach) bei 250 UpM inkubiert. Abweichend von diesem Verfahren erfolgte die Anzucht der *C. sporogenes*-Kulturen in zu 75 % gefüllten Laborflaschen mit Be- und Entlüftungsaufsatz. Während der Inkubation durchströmte steril filtrierter Stickstoff mit einem Druck von 0,7 bar das Medium, so dass sowohl ein anaerobes Milieu als auch die Durchmischung der Kultur gewährleistet war.

Eine weitere Ausnahme stellte die Anzucht von *A. niger* dar. Da eine direkte Anzucht von *A. niger* in flüssigem Nährmedium nicht möglich war (Bildung größerer Zellverbände in Form von Myzelien, keine reproduzierbare Zellzahlbestimmung möglich), wurden zunächst größere Mengen an Pilzsporen erzeugt. Dies geschah durch Ausplattieren einer aus der Dauerkultur und CASO-Bouillon gebildeten Zell- und Sporensuspension. Die so beimpften Agar-Platten wurden bei 30°C für mindestens eine Woche inkubiert. Danach erfolgte die Abschwemmung der gebildeten Konidien mit 20 ml Waschflüssigkeit (isotone Natriumchloridlösung + 0,5 g/l Triton® X 100) pro Agar-Platte. Der Zusatz des Tensides Triton® X 100 war für die Benetzung der hydrophoben Oberfläche des Pilzrasens erforderlich. Für einen Versuchsansatz von 250 ml wurden von 2 Agar-Platten jeweils

12,5 ml Sporensuspension abpipettiert und mit 225 ml flüssigem Nährmedium vereinigt. Die Ankeimung der Sporen erfolgte bei 30°C auf dem Rundschtüttler mit 250 UpM. Eine Zusammenfassung der für die jeweiligen Mikroorganismen geltenden Inkubationsbedingungen ist Tab. 1 zu entnehmen.

2.2.2.4 TRÜBUNGSMESSUNG

Das Wachstumsverhalten der Mikroorganismenkulturen wurde anhand der Zunahme der optischen Dichte (OD₆₀₀) mit einem Photometer (PU 8625, Philips, Hamburg) bestimmt. Die Messungen erfolgten immer unverdünnt in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen unbeimpftes Nährmedium.

2.2.2.5 KEIMZAHLBESTIMMUNG

Um die Anzahl von koloniebildenden Einheiten auf einer Agar-Platte bestimmen zu können, mussten von den Flüssigkulturen Verdünnungsreihen angelegt werden (Verdünnungsschritte 1:10); dies erfolgte mit steriler isotoner Kochsalzlösung. Jeweils 100 µl Keimsuspension wurden auf die sterilen Agar-Platten mittels Drigalskispatel ausplattiert. Pro untersuchter Verdünnungsstufe wurden zwei Agar-Platten beimpft und ausgewertet. Die Zählung der gewachsenen Kolonien erfolgte in Abhängigkeit von deren Wachstumsgeschwindigkeit nach Inkubationszeiten von 12-96 h.

Abweichend von dieser Methode zur Keimzahlbestimmung wurde dem Agar-Medium bei der Bestimmung von *A. niger* 0,5 g/l Triton[®] X 100 zugesetzt, um ein Zusammenwachsen der Kolonien zu einem Rasen zu vermeiden.

Die Keimzahlbestimmung der *C. sporogenes* Kulturen erfolgte nach dem Gussplattenverfahren. Dabei wurden 0,9 ml der nach dem oben genannten Verdünnungsverfahren hergestellten Proben mit ca. 15 ml flüssigem und ca. 50°C warmen Fleisch-Leber-Agar vermischt und nach dem Erstarren des Agars im Anaerobtopf in sauerstoffabgereicherter Atmosphäre (Anaerocult[®] C, Merck, Darmstadt) bei 37°C inkubiert.

Um den Koinzidenzfehler zu minimieren und somit eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wurden bei der Lebendkeimzahlbestimmung nur Agar-Platten jener Verdünnungsstufen berücksichtigt, die mindestens 20 und maximal 300 Kolonien pro Platte aufwiesen. Die Berechnung erfolgte über das gewogene arithmetische Mittel (siehe Gl. 1)

$$m = \frac{10^x}{V} \cdot \frac{\sum c_x + \sum c_{x+1}}{n_x + n_{x+1}} \cdot 0,1 \quad [\text{Gl. 1}]$$

m	gewogenes arithmetisches Mittel
10^x	Verdünnungsfaktor für die niedrigste ausgewertete Verdünnungsstufe
V	pro Platte aufgetragenes Volumen Zellsuspension in ml
$\sum c_x$	Gesamtzahl der Kolonien auf n_x Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
$\sum c_{x+1}$	Gesamtzahl der Kolonien auf n_{x+1} Platten der nächst höheren ausgewerteten Verdünnungsstufe

2.2.2.6 ZELLFÄRBUNG

Gramfärbung

Die Zellsuspension wurde dünn auf den Objektträger aufgetragen, trocknen gelassen und hitzefixiert. Danach wurden die Zellen 2 min mit Kristallviolettlösung überschichtet und anschließend zur Fixierung des Farbstoffes in der Zellwand mit Lugolscher Lösung gespült und mit dieser ebenfalls für 2 min überschichtet. Diese Lösung wurde im Wechsel zweimal mit Wasser und einmal mit Ethanol abgespült. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Safraninlösung zur Anfärbung gramnegativer Zellen, ebenfalls durch Überschichten mit der Farbstofflösung für 2 min. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes wurde mit Wasser gespült. Nach dieser Behandlung waren grampositive Bakterien dunkelblau bis blauviolett, gramnegative Bakterien rot bis orange gefärbt.

Live/Dead-Färbung

Die Live/Dead-Färbung wurde mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012 nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die Methode erlaubte die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterienzellen durch Anfärbung mit den zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffen. Das Prinzip der Anfärbung beruht auf einer unterschiedlichen Permeabilität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, wobei SYTO® 9 green die intakte Zellmembran passieren kann, der zweite Farbstoff (Propidiumiodid) jedoch nicht. Bei vorhandenen Membrandefekten dringt Propidiumiodid in die Zelle ein und verdrängt aufgrund einer stärkeren Affinität SYTO® 9 green von den Zielstrukturen.

2.2.2.7 MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG (LICHTMIKROSKOPIE, REM)

Lichtmikroskopie

Die Untersuchungen im Hellfeld nach Gramfärbung, im Phasenkontrast bei unbehandelten Proben sowie im Fluoreszenzlicht nach Live/Dead®-Färbung wurden mit einem IX71 Mikroskop (Olympus, Hamburg) durchgeführt. Die Präparation der im Hellfeld bzw. im

Phasenkontrast zu betrachtenden Proben erfolgte direkt auf einen Objektträger. Die mittels Live/Dead[®] Kit angefärbten Zellen wurden in 10 ml isotoner Kochsalzlösung suspendiert und durch einen Nucleopore[®] Filter (Waterman, Newton, USA) mit einer nominalen Porenweite von 0,22 µm filtriert. Im Anschluss daran wurde der Filter auf einen Objektträger präpariert und im Auflichtmodus im Fluoreszenzlicht betrachtet.

REM

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden jeweils 1 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 10^7 - 10^8 KBE/ml in 10 ml isotoner Kochsalzlösung dispergiert und durch einen Nucleopore[®] Filter mit einer nominalen Porenweite von 0,22 µm filtriert. Im Anschluss erfolgte, nach Trocknung der Proben, die Graphit-Bedampfung im Hochvakuum. Als Rasterelektronenmikroskop kam ein Leo 1525 Gemini (Carl Zeiss, Oberkochen) zum Einsatz.

2.2.2.8 BESTIMMUNG DER GRÖßENVERTEILUNG (MIKROSKOPIE, LASER-DIFFRAKTOMETRIE)

Mikroskopie

Die Auswertung der mikroskopischen Bilder erfolgte manuell durch Ausmessen der Zellen. Zu diesem Zweck wurden die stäbchenförmigen Bakterien mathematisch in zwei geometrische Grundkörper zerlegt, den geraden Kreiszyylinder und die Halbkugel. Der gerade Kreiszyylinder konnte über die Breite und die Länge der Zelle eindeutig bestimmt werden. Dabei war die Zelllänge so definiert, dass die abgerundeten Enden nicht berücksichtigt wurden. Diese wurden gesondert durch zwei Halbkugeln beschrieben. Somit setzte sich die Gesamtlänge einer stäbchenförmigen Zelle aus den Radien der beiden Halbkugeln und der Höhe des Kreiszyinders zusammen. Die Berechnung der Oberfläche der Zelle A_{Ges} erfolgte nach Gl. 2 aus der Mantelfläche des Kreiszyinders A_{Mantel} und der Oberfläche der zu einer Kugel zusammengefassten deckungsgleichen Halbkugeln (A_{Kugel}). In Analogie dazu wurde das Zellvolumen V_{Ges} aus den Volumina des Zylinders und der Kugel berechnet (Gl. 3).

$$A_{Ges} = A_{Mantel} + A_{Kugel} \quad [Gl. 2a]$$

$$A_{Ges} = \pi dh + 4\pi r^2 = \pi(dh + 4r^2) \quad [Gl. 2b]$$

$$V_{Ges} = V_{Zylinder} + V_{Kugel} \quad [Gl. 3a]$$

$$V_{\text{Ges}} = \frac{\pi}{4}d^2h + \frac{4}{3}\pi r^3 = \pi\left(\frac{1}{4}d^2h + \frac{4}{3}r^3\right) \quad [\text{Gl. 3b}]$$

- d Durchmesser des geraden Kreiszylinders
h Höhe des geraden Kreiszylinders
r Radius der Kugel

Die Bestimmung des Durchmessers von kugelförmigen Zellen erfolgte mithilfe des statistischen Durchmessers nach Feret. Dabei wurde der Abstand zweier vertikaler, an die Projektionsfläche der Zelle angelegter, Tangenten bestimmt. Bei der Berechnung der Oberfläche und des Volumens konnten somit Abweichungen von der idealen Kugelform vernachlässigt werden.

Laserdiffraktometrie

Die Größenverteilung der Zellsuspensionen wurde mittels Laserdiffraktometrie bestimmt. Die Messung beruht auf dem Prinzip der Laserbeugung an einem Partikelkollektiv. Die Summe der Fraunhofer'schen Beugungsspektren der Einzelpartikel ergibt dabei eine Intensitätsverteilung, welche mit einem in 31 Ringe gegliederten Photodetektor aufgenommen wird. Aus dieser Intensitätsverteilung wird die Größenverteilung der dieses Spektrum erzeugenden Partikel berechnet. Bei nicht-sphärischen Partikeln erhält man eine Verteilung von Kugeldurchmessern sphärischer Partikel gleicher optischer Eigenschaften (Äquivalentdurchmesser).

Das verwendete Messsystem bestand aus einem HELOS 12 KA/LA Laserbeugungssensor und einer SUCELL 12CL Nassdispergiereinheit mit einer 2 mm Durchflussküvette (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld). Die Auswertung der aufgenommenen Intensitätsverteilungen erfolgte mit der Software des Geräteherstellers (Windox 3.2). Das System wurde mit dem Referenzmaterial des Herstellers kalibriert. Dabei handelte es sich um Siliciumcarbid-Partikel eines mittleren Teilchendurchmessers von 27 µm (SiC-P600'06). Darüber hinaus wurde vor jeder Messreihe eine Referenzmessung mit gereinigtem Wasser durchgeführt.

Die zu vermessenden Zellsuspensionen, d.h. Mikroorganismenkulturen unterschiedlichen Alters in CASO-Bouillon, wurden durch Verdünnung mit isotoner Natriumchloridlösung auf OD₆₀₀-Werte von maximal 0,4 eingestellt. Der Messbereich der verwendeten Linse betrug 0,5-175 µm. Jede Zellsuspension wurde dreimal ohne vorherige Ultraschall-Dispergierung für 10 s vermessen. Im Anschluss erfolgten jeweils drei weitere Messungen nach vorheriger Ultraschallbehandlung von 60 bzw. 300 s bis zur Konstanz des mittleren

Teilchendurchmessers. Dieses Vorgehen war erforderlich, da besonders junge Kulturen durch aneinander haftende Zellen zunächst zwei Partikelkollektive aufwiesen. Aus Sicherheitsgründen konnten, mit Ausnahme von *B. diminuta* und *C. albicans*, nur Mikroorganismen der Risikoklasse I vermessen werden. Die Zellgrößenbestimmung von *B. diminuta* war erforderlich, da diese Spezies als Modellorganismus für gramnegative Bakterien sehr häufig bei den in Kap. 3 beschriebenen Druckwechselprozessen eingesetzt worden ist. Eine genaue Kenntnis der Größenverhältnisse war daher unerlässlich. Die Vermessung des Pilzes *C. albicans* war wegen dessen für die Laserdiffraktometrie günstiger Form und Größe von grundsätzlichem Interesse.

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte durch Auftragung der Verteilungssumme (Durchgangssumme) Q_3 und der Volumenverteilungsdichte q_3 im halblogarithmischen Koordinatensystem gegen den Äquivalentdurchmesser. Unter der Verteilungssumme versteht man dabei den Anteil der Partikel im jeweiligen Intervall bezogen auf die Gesamtmenge. Der Quotient aus dem Mengenanteil ΔQ_3 und der dazu gehörigen Klassenbreite Δd ergibt die Volumenverteilungsdichte q_3 . Für die halblogarithmische Darstellung wird q_3 durch Multiplikation mit dem mittleren Partikeldurchmesser des jeweiligen Intervalls in q_3 transformiert.

2.2.2.9 DYNAMISCHE DIFFERENZKALORIMETRIE (DSC)

Bei der dynamischen Differenzkalorimetrie wird die zu vermessende Probe und eine Referenz einem definierten Temperaturprogramm unterworfen und die zu- oder abgeführte Wärmeleistung bestimmt. Dies kann entweder nach dem Prinzip der Wärmestrommessung oder der Leistungskompensation erfolgen. Letzteres Messprinzip wurde bei der verwendeten DSC 7 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) realisiert. In der Peripherie kamen darüber hinaus die Steuereinheit TAC 7/DX, ebenfalls von Perkin Elmer, und das Kryostat Lauda RL6 (Lauda, Lauda-Königshofen) zum Einsatz. Die Auswertung der erzeugten Daten wurde mit der Software Pyris 8.0 durchgeführt. Im Vorfeld der Messungen erfolgte eine Kalibrierung der Anlage mit Indium und demineralisiertem Wasser. Sämtliche DSC-Messungen wurden anschließend bei einer Aufheizrate von 10 K/min in einem Temperaturbereich von 20-100°C durchgeführt. Die Proben wurden in hermetisch verschlossenen Probeniegeln (Volumen 30 μ l, Druckhaltevermögen 3 bar, Temperaturbeständigkeit -170-600°C) bei Einwaagen von 15-20 mg vermessen. Als Referenz dienten Leertiegel desselben Typs. Jede Probe wurde zweimal vermessen. Die Auswertung der

Thermogramme erfolgte anschließend aus der resultierenden Differenzkurve; es wurden jeweils die Onset-Temperaturen bestimmt.

Die messtechnische Erfassung des Wärmestroms während der temperaturinduzierten Umwandlungsprozesse erfordert eine möglichst hohe Zellzahl. Daher erfolgte die Anzucht der zu vermessenden Mikroorganismenkulturen unter den jeweiligen Standardbedingungen für 27 bis 31 h (Kap. 2.2.1.1). Zur weiteren Aufkonzentrierung schlossen sich daran zwei Zentrifugationsschritte an. Dazu wurden 10 ml Zellsuspension entnommen und für 20 min bei 3.000 UpM (Medifuge, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in 1 ml isotoner Natriumchlorid-Lösung redispersiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 10.000 UpM nochmals für 10 min zentrifugiert (Mikrozentrifuge Galaxy 14D, VWR, Darmstadt). Das nach Abpipettieren des Überstandes erhaltene pastöse Zellkonzentrat konnte dann mit einem Spatel in den Probeniegel überführt werden.

2.2.2.10 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE (AFM)

Der Aufbau eines Rasterkraftmikroskops ist in Abb. 3 A schematisch dargestellt. Während der Messung wird die an einen Cantilever angebrachte Spitze (Abb. 3 B) zeilenweise über die Oberfläche der Probe geführt. Je nach Fragestellung und in Abhängigkeit von den Probeneigenschaften stehen mehrere Messmodi zur Verfügung. Unterschieden wird zwischen Kontakt-Modus, Semikontakt-Modus und Nichtkontakt-Modus. Die Messung kann, bezogen auf den Cantilever, jeweils ungerichtet im „constant height mode“ oder geregelt im „constant force mode“ erfolgen. Letzterer ist aufgrund der geringeren Probenbelastung für biologische Proben zu bevorzugen.

Bei der dargestellten Messanordnung erfolgt die Bewegung der Probe in alle Richtungen durch den Probenstisch (Piezo-Scanner), der Cantilever verändert seine Position dabei nicht. Je nach Oberflächenbeschaffenheit der Probe biegt sich die Spitze des Cantilevers unterschiedlich stark. Die vertikale Positionsänderung wird dabei von einem auf die Cantileverspitze fokussierten Laserstrahl auf eine Photodiode übertragen und es entsteht ein digitales Bild der Oberfläche.

Neben der reinen Abbildung von Oberflächen sind auch rasterkraftspektroskopische Untersuchungen möglich. Dabei wird an diskreten Punkten der Oberfläche die Abstandsabhängigkeit der Kraft zwischen Spitze und Probe gemessen. Die resultierende Kraft ergibt sich nach dem Hook'schen Gesetz aus der Federkonstante des Cantilevers und dessen Auslenkung. Anhand der erhaltenen Kraft-Abstand-Kurven sind Rückschlüsse auf die elastischen Eigenschaften der Probe möglich. Chemisch funktionalisierte Spitzen erlauben darüber hinaus die Bestimmung der Ladungsverteilung auf der Probenoberfläche [29].

Das für die Untersuchung der Zelleigenschaften verwendete Rasterkraftmikroskop bestand aus einem Zeiss Axivert 200 Lichtmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) und einer AFM-Messeinheit (Asylum Research, Santa Barbara, USA) mit Siliciumnitrid-Cantilevern (Veeco Probes, Plainview, USA) einer Federkonstante von 10 mN/m.

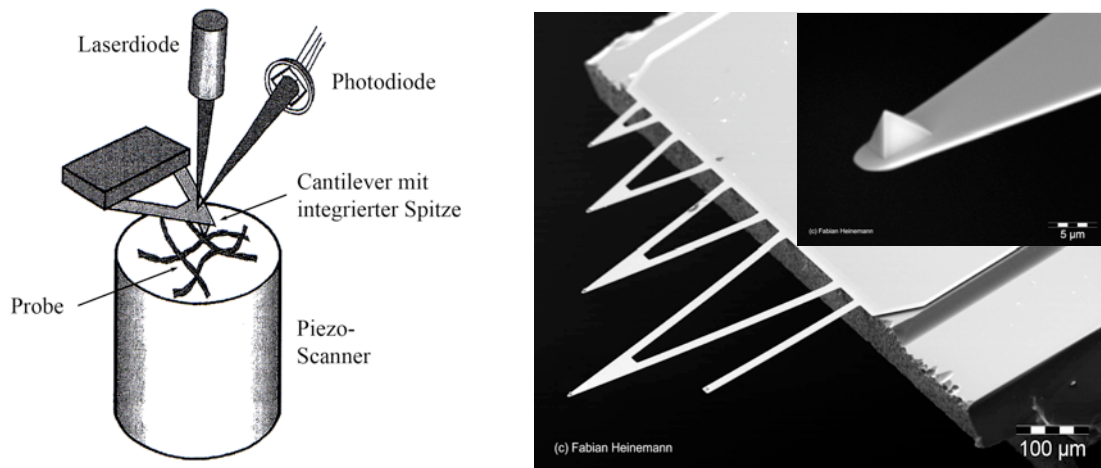


Abb. 3 A: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops; B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Siliciumnitrid-Chips mit Cantilever verschiedener Federkraft (je länger der Cantilever, desto geringer die Federkraft) [30]

Eine erste Abschätzung der elastischen Eigenschaften ist über die Berechnung der Federkonstante der Mikroorganismenzellwand k_z (Steifigkeit) möglich. Dafür wird ein linearer Zusammenhang zwischen Eindringtiefe und korrespondierender Kraft angenommen (Gl. 4). k_C ist dabei die Federkonstante des Cantilevers und s der Anstieg der Kraft-Abstand-Kurve. Die Geometrie der Spitze sowie die Kontaktfläche Spitze/Substrat bleiben unberücksichtigt.

$$k_z = k_C \frac{s}{1-s} \quad [\text{Gl. 4}]$$

Für eine genaue Bestimmung der elastischen Eigenschaften muss jedoch berücksichtigt werden, dass Kraftkurven von weichen Proben im Gegensatz zu Kraftkurven von harten Proben nach Überschreiten des Kontaktpunktes ein nicht-lineares Verhalten aufweisen. Ursache hierfür ist die sich verändernde Kontaktfläche zwischen AFM-Spitze und Probe bei voranschreitender Belastung. Zur Berechnung des E-Moduls ist daher eine Anpassung der Kraft-Abstand-Kurven an ein geeignetes Modell notwendig. Das Hertz-Modell, 1882 von Heinrich Hertz entwickelt, ist das dafür am häufigsten verwendete [26, 30-33]. Das Modell beschreibt den Verlauf des Eindrückens einer starren Spitze in eine unendlich große, isotrope und elastische Oberfläche. Trotz der Endlichkeit einer Zelle, deren

anisotropen Aufbaus und der viskoelastischen Eigenschaften kann das Modell verwendet werden, vorausgesetzt die Geschwindigkeit des Eindrückens ist langsam genug. Den Zusammenhang zwischen der einwirkenden Kraft F und der resultierenden Eindringtiefe δ in Abhängigkeit von der Geometrie der AFM-Spitze (Öffnungswinkel der konischen Spitze α) und den elastischen Eigenschaften (E-Modul, Poissonzahl ν) des zu untersuchenden Materials gibt Gl. 5 wieder [33]. Die Poissonzahl ist dabei ein Maß für die zum Kraftvektor orthogonale Dehnung des Untersuchungsmaterials während der Messung. Je geringer die Kompressibilität des Materials, desto größer ist der Wert für die Poissonzahl, wobei übliche Werte im Bereich von 0 (stark komprimierbar) bis 0,5 (nicht komprimierbar) liegen. Für die Auswertung der vorliegenden Versuche wurde die für weiche, biologische Proben übliche Poissonzahl von 0,5 angenommen [26].

$$F = \delta^2 \cdot \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{1 - \nu^2} \cdot \tan \alpha \quad [\text{Gl. 5}]$$

Neben der Bestimmung des E-Moduls kann das Hertz-Modell bei Kenntnis der beaufschlagten Kraft und des E-Moduls der untersuchten Substanz auch zur Berechnung der Kontaktfläche zwischen AFM-Spitze und Probe herangezogen werden. Voraussetzung ist, dass die Probe eine flache Oberfläche aufweist. Diese Forderung wird bei einem Radius der AFM-Spitze von 20 nm und einem Zelldurchmesser von 200-5.000 nm erfüllt. Der unter Verwendung von AFM-Spitzen mit konischer Form resultierende Durchmesser der Kontaktfläche d berechnet sich nach Gl. 6.

$$d = 2 \cdot \sqrt{\frac{1 - \nu^2}{E} \cdot \frac{2\pi}{\tan \alpha} \cdot F} \quad [\text{Gl. 6}]$$

Die AFM-Messung stellt hohe Anforderungen an die Probenpräparation, insbesondere wenn es sich bei den Untersuchungsobjekten um lebende Zellen handelt. Einerseits ist eine hohe Haftkraft des Untersuchungsobjektes auf dem Untergrund notwendig, um eine Lageänderung der Probe während der Messung durch die auftretenden lateralen Kräfte zu verhindern. Andererseits darf die Präparation keine Änderungen der Zelleigenschaften verursachen. Eine Auswahl an möglichen Präparationsverfahren ist in Tab. 2 dargestellt. Besonders häufig findet die Filtration der Zellsuspension durch Filter mit einem der Zellgröße identischen Porendurchmesser Anwendung. Nachteil dieser Methode ist das auf kugelige Zellen begrenzte Einsatzgebiet.

Tab. 2: Präparationsverfahren für rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an Mikroorganismenzellen

Medium	Untergrund	Methode	Literatur
Nährmedium	Aluminiumoxid-Filter, Porenweite entspricht Zellgröße	Filtration, Überschichten des Filters mit Nährmedium	[34]
Nährmedium	Polycarbonat-Filter, Porenweite entspricht Zellgröße	Filtration, Überschichten des Filters mit Nährmedium	[29, 35-44]
demin. Wasser	Glas	Trocknung	[45]
3 %ige Agar-Lösung	Glas	Sandwichtechnik	[46]
5 mM/l HEPES-Puffer	silanisiertes Glas	Sandwichtechnik	[47, 48]
PBS-Puffer oder demin. Wasser	Poly-L-Lysin- beschichtetes Glas	Trocknung, Rehydratation	[6, 49]
10 mM/l Kaliumdi- hydrogenphosphat-Puffer	Poly-L-Lysin- beschichtetes Glas	Sandwichtechnik	[50]
Tris-Puffer	Polyethylenimin beschichtetes Glas	Sandwichtechnik	[51]
verschieden konzentrierte Kaliumchlorid- oder Natriumchloridlösungen	frisch gespaltener Glimmer	Sandwichtechnik	[52]
PBS-Puffer	frisch gespaltener Glimmer	Trocknung, Rehydratation	[40]
demin. Wasser	Poly-L-Lysin- beschichteter Glimmer	Trocknung	[53]

Eine räumliche Fixierung der Zellen, unabhängig von deren Form, ist durch das Einbetten in eine Agar-Phase möglich. Die Zellsuspension wird dabei auf einen Objektträger gegeben, mit flüssigem Agar überschichtet und mit einem Deckglas bedeckt. Nach dem Erstarren des Agars wird der Objektträger entfernt und durch vorsichtiges Spülen der Oberfläche werden die in den Agar eingebetteten Zellen teilweise wieder freigelegt. Um das Austrocknen der Zellen während der AFM-Messung zu verhindern, kann die Oberfläche mit einer wässrigen Phase überschichtet werden.

Bei den meisten anderen Methoden wird durch eine Vorbehandlung des Objektträgers (Veränderung der Oberflächenladung) bzw. durch Variation des Suspensionsmediums (Art und Konzentration der gelösten Ionen) die Physisorption der Zellen an den Untergrund

verstärkt. Zur Unterstützung des Sorptionsvorgangs wird während einer Inkubationszeit die Zellsuspension mit einem Deckglas abgedeckt (Sandwichtechnik), welches direkt vor der Messung wieder vorsichtig entfernt wird.

Eine weitere Möglichkeit zur Vergrößerung der Haftkräfte besteht darin, die Zellsuspension auf dem Objektträger antrocknen zu lassen. Nachfolgend können dann die Zellen direkt an der Luft oder nach vorsichtigem Überschichten mit Wasser in flüssiger Phase vermessen werden. Letzteres Verfahren hat den Vorteil, dass die Zellen nicht weiter austrocknen bzw. die Möglichkeit zur Rehydratation besteht. Aufgrund der hohen Haftkräfte ist die Vermessung der angetrockneten Zellen an der Luft besonders für die Darstellung morphologischer Zelleigenschaften geeignet, da eine höhere Auflösung erreicht werden kann [54]. Bei der Bestimmung elastischer Zelleigenschaften ist hingegen die Vermessung in wässriger Phase zu bevorzugen.

In Vorversuchen, die dem Auffinden der optimalen Präparationsmethode dienen sollten, kamen die in Kap. 2.2.1.4 genannten Trägermaterialien zum Einsatz. Als Suspensionsmedien unterschiedlicher Ionenstärke wurden neben den in Kap. 2.2.1.4 genannten Puffern isotone Natriumchloridlösung (154 mM/l) und Kaliumchloridlösung (50 mM/l) auf ihre Eignung untersucht. Zunächst erfolgte die Präparation nach der Sandwichtechnik, jedoch lieferte keine der betrachteten Kombinationen aus Trägermaterial und Suspensionsmedium zufriedenstellende Ergebnisse. Die erzeugten Haftkräfte waren in jedem Fall zu gering für eine rasterkraftmikroskopische Vermessung der Zellen. Die Trocknung der Zellsuspension auf einem Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger (5 min bei 35°C) mit anschließender Rehydratation durch Überschichten mit isotoner Natriumchloridlösung führte zu deutlich besseren Ergebnissen. Alle Zellen waren über einen Zeitraum von mindestens 30 min auf der Oberfläche des Objektträgers fixiert.

Die Präparation mit flüssigem Agar erwies sich als schwierig. Einerseits musste die Planparallelität der Agar-Schicht gewährleistet werden, da während der AFM-Messung Höhenunterschiede nur in sehr begrenztem Maß ausgeglichen werden können. Andererseits war die Aufarbeitung der Probe nach dem Erstarren des Agars störanfällig. Die Verwendung von Filtern zur Fixierung der Zellen in den Filterporen war aufgrund der Stäbchenform nicht möglich. Insgesamt erwies sich die Präparation durch Trocknung und Rehydratation der Zellsuspension auf dem Objektträger als am besten geeignet.

Die Probenpräparation für die AFM-Messungen wurde, ausgehend von den Ergebnissen der Vorversuche, wie folgt vorgenommen:

1. Waschen der Bakteriensuspension mit isotoner Natriumchloridlösung (dreimal)
2. 10 μl Bakteriensuspension auf dem Objektträger (StarFrost®-Adhäsiv-Polycat) verteilen
3. 5 min Trocknen bei 35°C
4. Überschichten mit isotoner Natriumchloridlösung (nur bei kraftspektroskopischen Versuchen)

Eine ausreichende Haftung der Bakterienzellen am Untergrund konnte mit dieser Präparationsmethode gewährleistet werden; dies belegen auch die in Abb. 4 dargestellten Messungen. Dabei handelt es sich um die Darstellung der Kontaktpunkte eines Bakterienzellkollektivs bei zwei aufeinander folgenden Messungen in isotoner Natriumchloridlösung. Die Wiederfindungsrate der Kontaktpunkte ist sehr hoch; es findet demnach keine Verschiebung der Bakterienzellen statt.

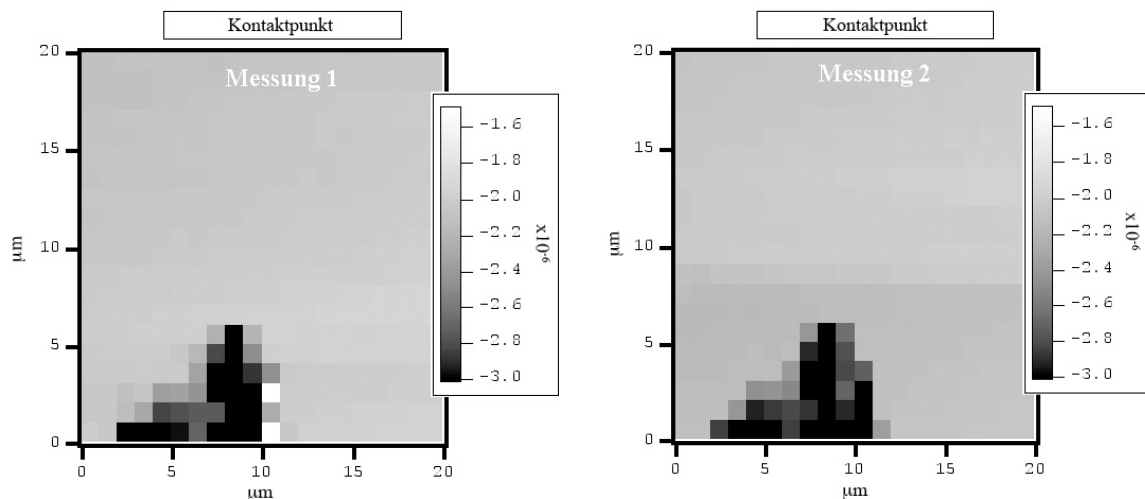


Abb. 4: Nacheinander aufgenommene Kraftkarten eines *B. atropheus* Bakterienzellkollektivs. Die Probenpräparation erfolgte auf einem Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger in isotoner Natriumchloridlösung. Dargestellt ist die Höhe des Kontaktpunktes.

2.3 ERGEBNISSE

2.3.1 VALIDIERUNG DER ANZUCHTBEDINGUNGEN

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Entkeimungsversuche zu gewährleisten, musste sichergestellt werden, dass mit Kulturen annähernd gleicher Ausgangskeimzahl und Wachstumsphase gearbeitet werden konnte. Als Standardbedingung wurde eine Populationsdichte zwischen $5 \cdot 10^7$ KBE/ml und $5 \cdot 10^8$ KBE/ml (exponentielle Wachstumsphase) festgelegt.

Die Einhaltung dieser Grenzen erforderte eine genaue Kenntnis der spezifischen Wachstumsparameter. Zu diesem Zweck wurden Wachstumsversuche durchgeführt, bei denen die Absorption der Kultur bei 600 nm (optische Dichte, OD_{600}) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmt wurde. Eine parallele Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE/ml) durch Ausplattieren der Zellsuspension auf Agar-Platten ermöglichte es, bei späteren Versuchen durch die einfache und schnelle Bestimmung der optischen Dichte auf die Zellzahl zu schließen. Die bei zunehmender Zelldichte größere Messungenauigkeit durch Streulicht wurde mathematisch nicht berücksichtigt, da einerseits parallel immer eine Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte und andererseits die durch optische Messung erhaltenen Ergebnisse für die Versuchsdurchführung hinreichend genau waren.

Ein weiteres Ziel der nachfolgend dargestellten Wachstumsversuche lag in der Vereinheitlichung der Anzuchtbedingungen, insbesondere der Inkubationstemperatur und der zu verwendenden Nährböden, zur Vereinfachung der Laborroutine. CASO-Agar wurde dabei, mit Ausnahme der *C. sporogenes* Versuche, als Standard festgelegt und mit R2A-Agar, Fleisch-Leber-Agar und Pseudomonas P-Agar verglichen.

2.3.1.1 GRAMPOSITIVE BAKTERIEN

Bacillus atropheus

Die Anzucht der Organismen erfolgte in CASO-Bouillon bei einer Inkubationstemperatur von 35°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 250 UpM (Abb. 5). Der Wachstumskurve ist zu entnehmen, dass die exponentielle Wachstumsphase nach ca. 3-4 h Inkubation beginnt und sich über einen Zeitraum von ca. 4 h erstreckt. Nach insgesamt 8 h geht die Mikroorganismenkultur in die stationäre Wachstumsphase über. Eine leichte Reduktion der Lebendkeimzahl nach 40 h Inkubation lässt auf den Beginn der Absterbephase schließen.

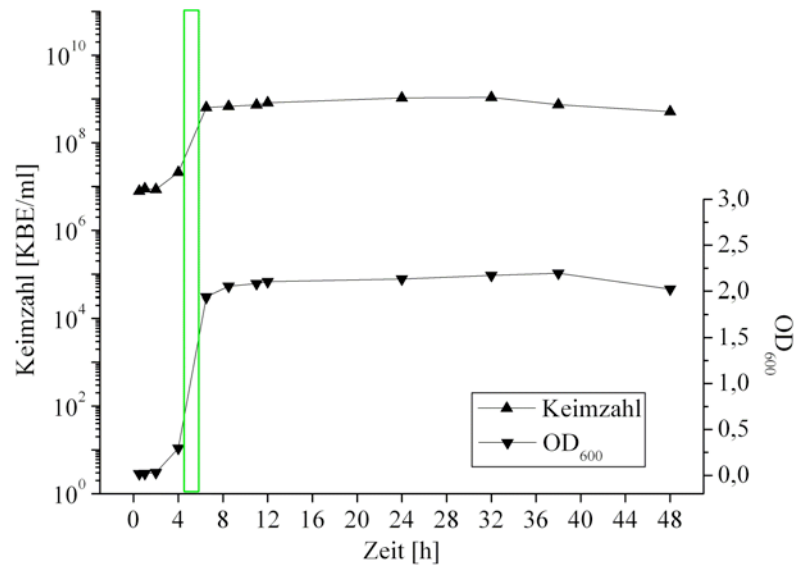


Abb. 5: Wachstumskurve von *B. atropheus* bei 35°C in CASO-Bouillon; Balken: Arbeitsbereich für spätere Druckwechselversuche

Für die Bestimmung der Lebendkeimzahl kam nach der Vorschrift des Europäischen Arzneibuchs CASO-Agar als Universalnährboden zum Einsatz. Darüber hinaus wurde das Wachstumsverhalten von *B. atropheus* auf R2A-Agar, ebenfalls ein Universalnährboden, Fleisch-Leber-Agar und Pseudomonas P-Agar untersucht (Abb. 6). Da unter Verwendung dieser verschiedenen Nährmedien jedoch kein besseres Wachstum der Keime, erkennbar an Koloniegröße und Anzahl der KBE bei gleicher Verdünnungsstufe, zu beobachten war und auch zur Vereinfachung der Laborroutine kam bei den nachfolgenden Versuchen ausschließlich CASO-Agar zum Einsatz. Wie Abb. 5 zu entnehmen ist, wird die für spätere Druckwechselversuche angestrebte Ausgangskeimzahl von 10^8 KBE/ml nach einer Inkubationszeit von ca. 4-5 h erreicht.

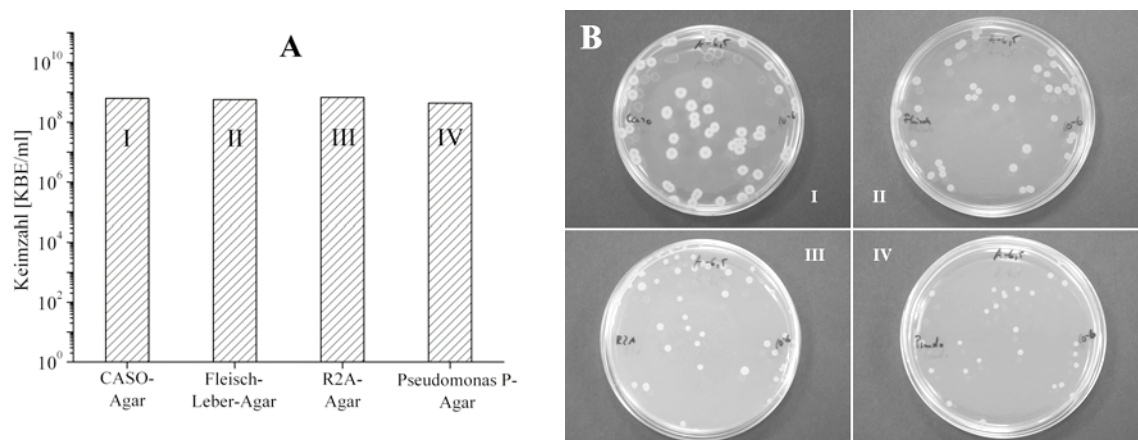


Abb. 6: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 6,5 h inkubierten *B. atropheus* Kultur in CASO-Bouillon. A: ermittelte Keimzahl; B: Bewuchs der Agar-Platten nach 24 h Inkubation, Verdünnung: 10^{-6}

Bacillus pumilus

In Analogie zu den Wachstumsversuchen an *B. atropeus* erfolgte auch bei *B. pumilus* die Anzucht in CASO-Bouillon, jedoch bei einer Inkubationstemperatur von 30°C (Abb. 7). Exponentielles Wachstum setzte auch hier nach ca. 4 h ein, so dass die benötigte Zelldichte nach einer Inkubationszeit von 4,25-6 h erreicht war. Nach ca. 8 h Inkubation war die stationäre Wachstumsphase erreicht. Die sich anschließende Absterbephase lag außerhalb des Beobachtungszeitraums von 48 h.

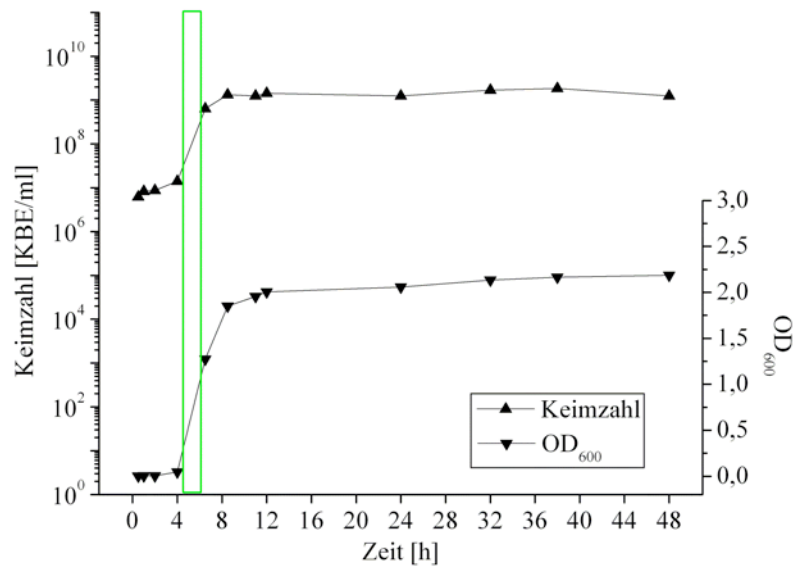


Abb. 7: Wachstumskurve von *B. pumilus* bei 30°C in CASO-Bouillon; Balken: Arbeitsbereich für spätere Druckwechselfersuche

Die eingesetzten Nährböden erwiesen sich als nahezu gleichwertig; lediglich unter Verwendung des R2A-Agars kam es zu einem deutlichen Schwärmen der Kolonien. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte bei weiteren Versuchen CASO-Agar als Universalnährmedium eingesetzt werden (Abb. 8).

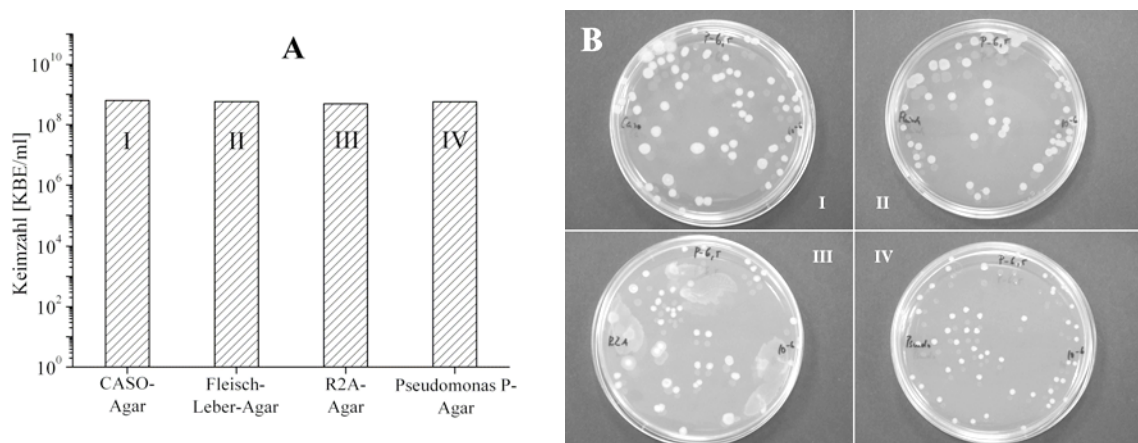


Abb. 8: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 6,5 h inkubierten *B. pumilus* Kultur in CASO-Bouillon. A: ermittelte Keimzahl; B: Bewuchs der Agar-Platten nach 36 h Inkubation, Verdünnung: 10⁻⁶

Geobacillus stearothermophilus

Die Anzucht der thermophilen Bakterienspezies *G. stearothermophilus* erfolgte in CASO-Bouillon bei einer Inkubationstemperatur von 50°C auf dem Rundschtüttler bei 250 UpM. Die für die Bestimmung der Lebendzellzahl beimpften CASO-Agar-Platten wurden ebenfalls bei 50°C inkubiert. Die erforderliche Zelldichte von 10^8 KBE/ml konnte, bedingt durch eine ausgeprägte Anlauf-Phase, erst nach ca. 11 h erreicht werden (Abb. 9). Die maximal erreichte Zelldichte lag mit $8 \cdot 10^8$ KBE/ml leicht unter den Werten von *B. atropheus* und *B. diminuta*.

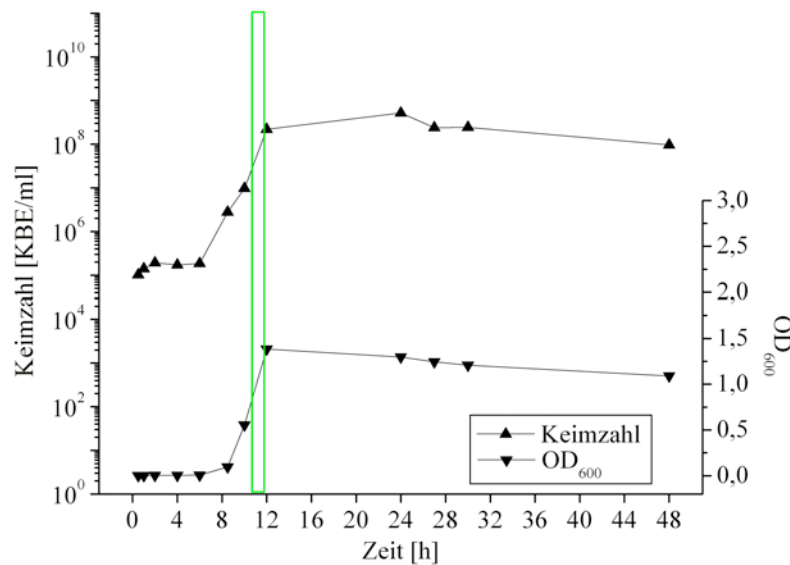


Abb. 9: Wachstumskurve von *G. stearothermophilus* bei 50°C in CASO-Bouillon; Balken: Arbeitsbereich für spätere Druckwechselversuche

Der Test auf Eignung der verschiedenen Nährböden fiel im Vergleich zu den Ergebnissen der *Bacillus* Spezies differenzierter aus. Die Universalnährböden und der Fleisch-Leber-Agar wiesen ähnlich gute Wiederfindungsraten auf; das Nährstoffangebot des Pseudomonas P-Agar führte jedoch zu einem deutlich verminderten Wachstum (Abb. 10).

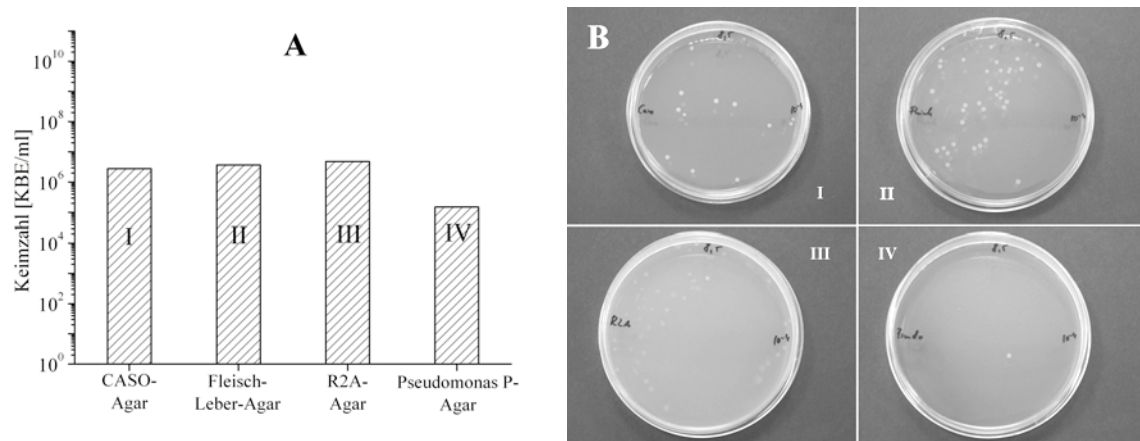


Abb. 10: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 8,5 h inkubierten *G. stearothermophilus* Kultur in CASO-Bouillon. A: ermittelte Keimzahl; B: Bewuchs der Agar-Platten nach 36 h Inkubation, Verdünnung: 10^{-4}

Staphylococcus aureus ssp. *aureus*

Die Standardbedingungen - Inkubation bei 30°C und 250 UpM auf dem Rundschüttler sowie die Verwendung von CASO-Bouillon zur Erzeugung der Flüssigkultur - konnten auch bei der Anzucht von *S. aureus* Anwendung finden. Die gewünschte Zelldichte von 10^8 KBE/ml wurde, bedingt durch eine kurze lag-Phase, nach 3-5 h erreicht (Abb. 11).

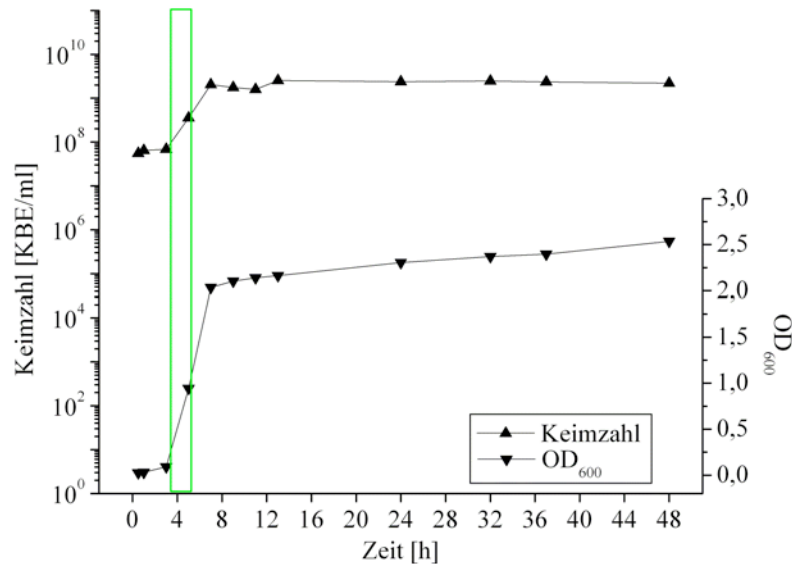


Abb. 11: Wachstumskurve von *S. aureus* bei 30°C in CASO-Bouillon; Balken: Arbeitsbereich für spätere Druckwechselfersuche

Die Wachstumsversuche mit den verschiedenen Nährböden ergaben in allen Fällen eine vergleichbar hohe Wiederfindungsrate, so dass zur Vereinfachung bei allen weiteren *S. aureus* Versuchen die Bestimmung der Lebendzellzahl unter Verwendung von CASO-Agar erfolgen konnte (Abb. 12).

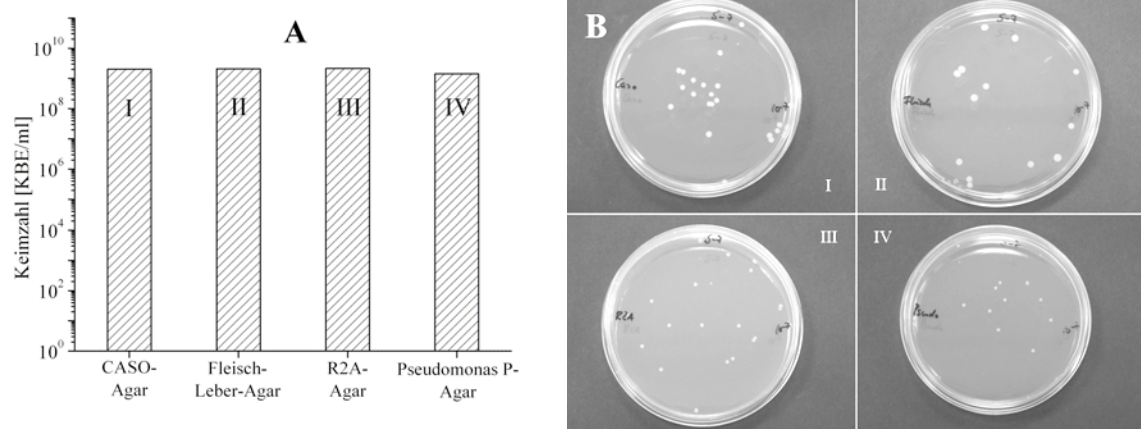


Abb. 12: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 7 h inkubierten *S. aureus* Kultur in CASO-Bouillon. A: ermittelte Keimzahl; B: Bewuchs der Agar-Platten nach 24 h Inkubation, Verdünnung: 10^{-7}

Clostridium sporogenes

Der obligat anaerobe Keim *C. sporogenes* erforderte für Anzucht und Zellzahlbestimmung ein gesondertes Vorgehen. Als Flüssignährmedium kam Thioglycolat-Bouillon zum Einsatz. Das Nährmedium wurde nicht, wie bei den aeroben Keimen, auf einem Rundschüttler bewegt, sondern mit Stickstoff (0,7 bar) durchströmt, was einerseits anaerobe Bedingungen sicherstellte und andererseits eine gute Durchmischung gewährleistete. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte im Gussplattenverfahren mit ca. 50°C warmem Fleisch-Leber-Agar. Alternativ dazu wurde Thioglycolat-Nährboden G mit 1,5 % Agar-Agar verwendet. Die Gussplatten wurden im Anaerobentopf bei 37°C inkubiert. In den Anaerobentopf eingebrachte angefeuchtete Anaerocult®-Pads erzeugten das erforderliche sauerstoffabgereicherte Milieu. Wie aus Abb. 13 ersichtlich, wurde die für Druckwechselfersuche gewünschte Zelldichte erst nach einer Inkubationszeit von mindestens 32 h erreicht. Da die Forderung nach exponentiellem Wachstum ab diesem Zeitpunkt nicht mehr erfüllt wurde, mussten die Standardbedingungen für *C. sporogenes* Kulturen bezüglich der Zelldichte angepasst werden. Als Standard wurden hier Keimzahlen zwischen 10^6 und 10^7 KBE/ml definiert.

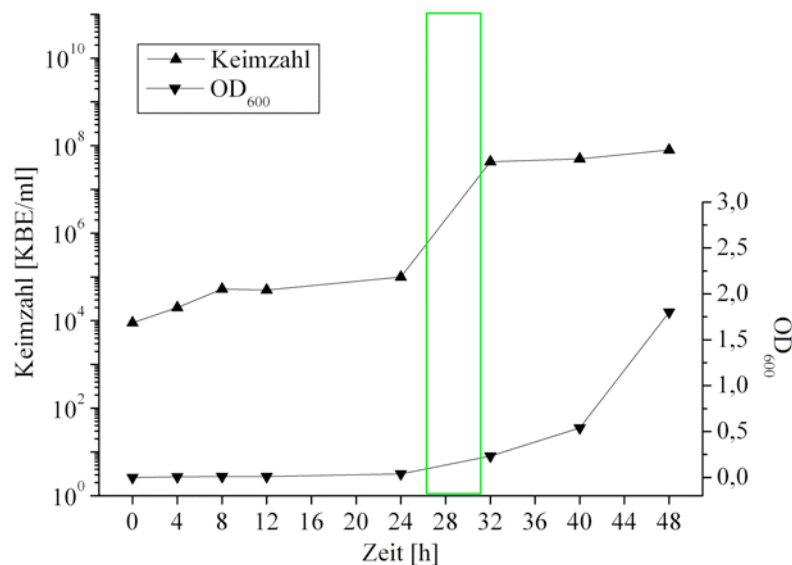


Abb. 13: Wachstumskurve von *C. sporogenes* bei 37°C in Thioglycolat-Bouillon; Balken: Arbeitsbereich für spätere Druckwechselfersuche

Die verwendeten Nährböden erwiesen sich beide als geeignet für die Bestimmung der Lebendzellzahl von *C. sporogenes* (Abb. 14). Das im Fleisch-Leber-Agar vorhandene Sulfit wird durch *C. sporogenes* zum Sulfid reduziert und bildet mit den vorhandenen Eisen-Ionen schwarzes Eisen(III)-sulfid [55]. Aufgrund der mit dieser Reaktion zusammenhängenden besseren Erkennbarkeit der *C. sporogenes* Kolonien wurde bei allen

weiteren Versuchen die Bestimmung der Lebendzellzahl mit Fleisch-Leber-Agar vorgenommen.

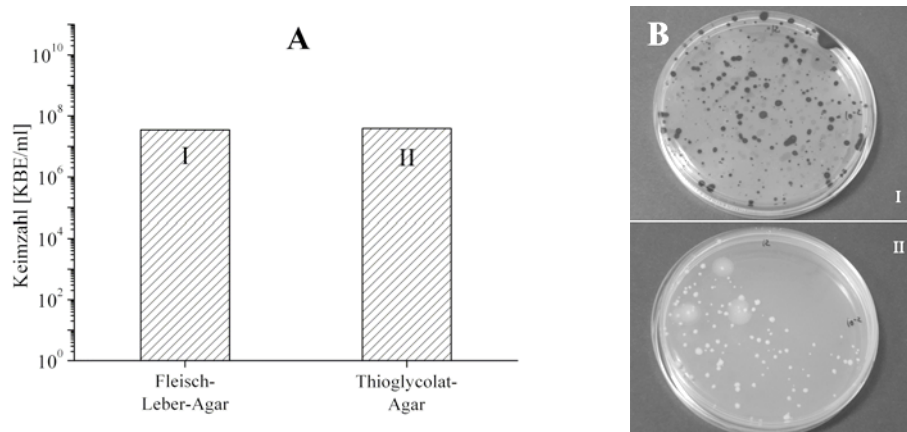


Abb. 14: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 12 h inkubierten *C. sporogenes* Kultur in CASO-Bouillon. A: ermittelte Keimzahl; B: Bewuchs der Agar-Platten nach 48 h Inkubation, Verdünnung: 10^{-2}

2.3.1.2 GRAMNEGATIVE BAKTERIEN

Brevundimonas diminuta

Bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens der gramnegativen obligat aeroben *B. diminuta* Kulturen konnte analog den Wachstumsversuchen einiger grampositiver Bakterien die Anzucht bei 30°C in CASO-Bouillon erfolgen. Die geforderte Keimzahl von 10^8 KBE/ml bei exponentiellem Wachstum wurde unter diesen Bedingungen nach ca. 6-7 h erreicht (Abb. 15). Die maximal erreichte Lebendkeimzahl von 10^{10} KBE/ml lag deutlich über den bisherigen Ergebnissen grampositiver Mikroorganismen.

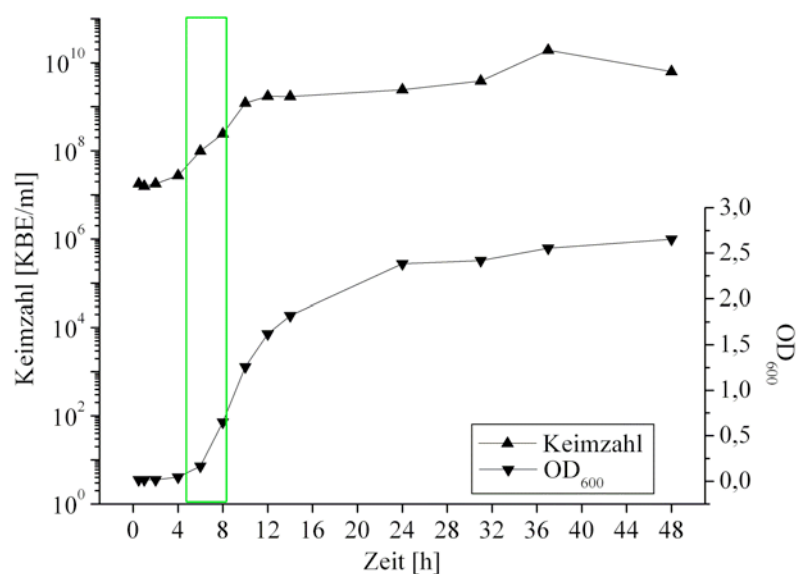


Abb. 15: Wachstumskurve von *B. diminuta* bei 30°C in CASO-Bouillon; Balken: Arbeitsbereich für spätere Druckwechselversuche

Wie in Abb. 16 dargestellt, war das Wachstum von *B. diminuta* auf allen getesteten Nährböden zufriedenstellend, so dass auch hier bei weiteren Versuchen auf CASO-Agar zurückgegriffen werden konnte.

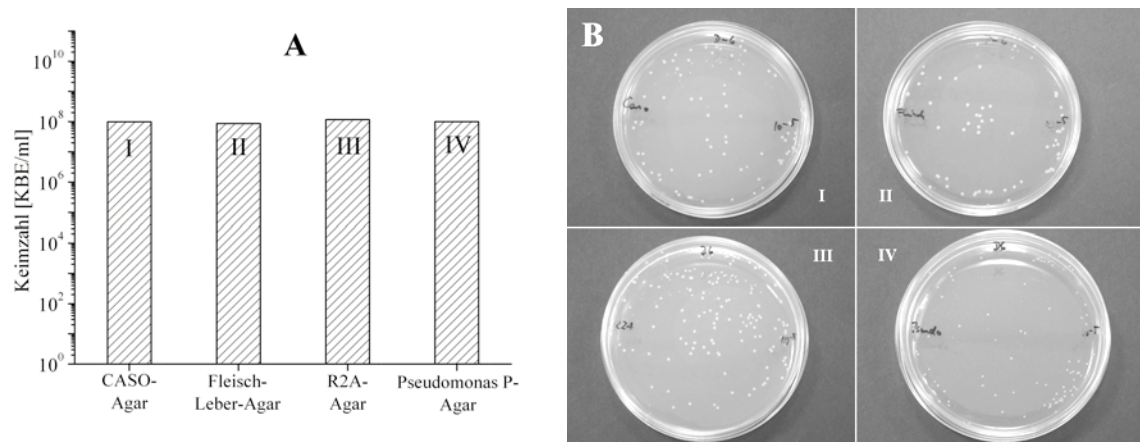


Abb. 16: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 6 h inkubierten *B. diminuta* Kultur in CASO-Bouillon. A: ermittelte Keimzahl; B: Bewuchs der Agar-Platten nach 24 h Inkubation, Verdünnung: 10^{-5}

Pseudomonas aeruginosa

Auch die Anzucht des gramnegativen Keimes *P. aeruginosa* konnte unter Beibehaltung der bisherigen Rahmenbedingungen – Inkubation bei 30°C , 250 UpM, CASO-Bouillon – erfolgen. Wie Abb. 17 zeigt, wurde die erforderliche Lebendkeimzahl nach ca. 6-8 h erreicht.

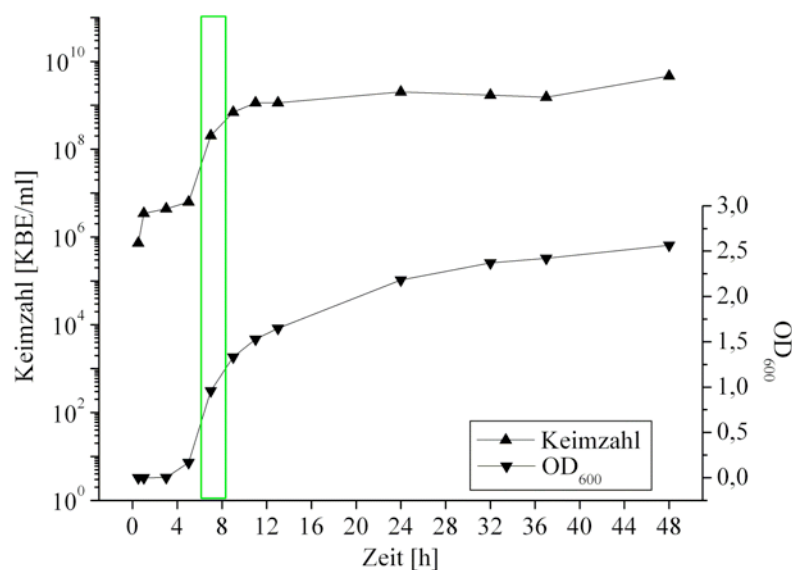


Abb. 17: Wachstumskurve von *P. aeruginosa* bei 30°C in CASO-Bouillon; Balken: Arbeitsbereich für spätere Druckwechselfersuche

Bei allen eingesetzten Nährböden kam es zu einem starken Schwärmen der monotrich begeißelten *P. aeruginosa* Keime mit der Folge, dass eine klare Abgrenzung der Kolonien

nicht immer möglich war. Insgesamt erwiesen sich auch hier alle untersuchten Nährböden in ihren nutritiven Eigenschaften als vergleichbar (Abb. 18).

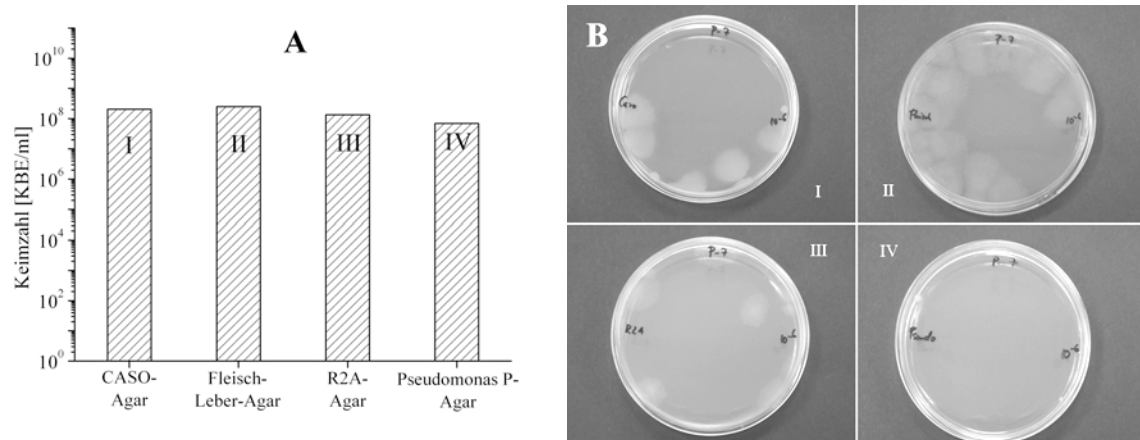


Abb. 18: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 7 h inkubierten *P. aeruginosa* Kultur in CASO-Bouillon. A: ermittelte Keimzahl; B: Bewuchs der Agar-Platten nach 36 h Inkubation, Verdünnung: 10⁻⁶

2.3.1.3 PILZE

Aspergillus niger

Eine direkte Bestimmung von Einzelzellen der reinen vegetativen Form des Deuteromyceten *A. niger* war aufgrund der Bildung größerer Zellverbände (Myzel) nicht möglich. Um auch hier, wie bei den Bakteriensuspensionen, eine reproduzierbare Zellzahlbestimmung bei den geplanten Druckwechselversuchen durchführen zu können, kamen vorgekeimte Sporensuspensionen zum Einsatz. Die Inkubationszeit der Sporensuspensionen wurde dabei so gewählt, dass einerseits der schützende Effekt der Spore nicht mehr gegeben war, sich aber andererseits die aus den Sporen hervorgegangenen vegetativen Zellen noch nicht zu größeren Zellverbänden zusammengeschlossen hatten. Wie Abb. 19 zeigt, waren nach 3 h Inkubation nur Schäden in der Sporenhülle zu erkennen, nach 8 h war eine deutliche Sprossung sichtbar und bereits nach 12 h lagerten sich die entstandenen Hyphen zu einem Myzel zusammen. Die Kolonien von *A. niger* neigen dazu, in kurzer Zeit zu einem Rasen zusammen zu wachsen. Durch den Zusatz oberflächenaktiver Substanzen kann das Koloniewachstum begrenzt und somit die Zählbarkeit der koloniebildenden Einheiten gewährleistet werden. In diesem Zusammenhang muss jedoch sichergestellt werden, dass alle vermehrungsfähigen Zellen erfasst werden. Zur Bestimmung der optimalen Zusammensetzung von Nährmedium und oberflächenaktiver Substanz wurden Malzextrakt-Agar- und CASO-Agar-Platten mit einem unterschiedlichen Gehalt an Triton[®] X-100 bzw. Tween[®] 80 hergestellt. Als Referenz diente das jeweils reine

Medium ohne Tensidzusatz. Alle Platten wurden mit der gleichen Menge einer Sporensuspension behandelt. Die Auswertung erfolgte nach 2-tägiger Inkubation bei 30°C.

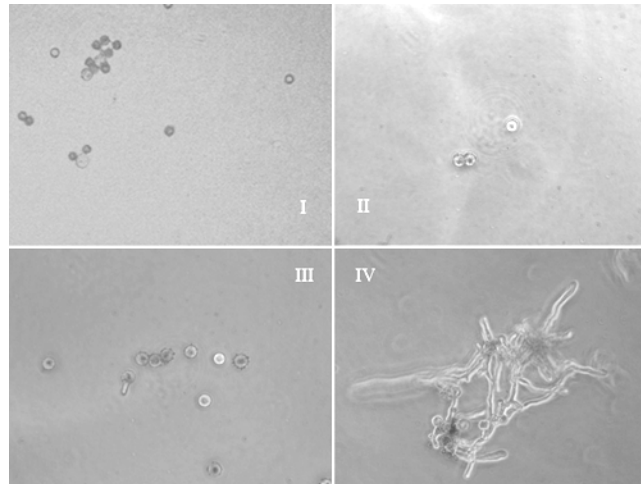


Abb. 19: *A. niger* Sporen nach Inkubation in CASO-Bouillon bei 30°C. I: 0 h Inkubation; II: 3 h Inkubation; III: 8h Inkubation; IV: 12 h Inkubation; Vergrößerung 250-fach

Wie Abb. 20 A zu entnehmen ist, weist Triton® X-100 in Verbindung mit CASO-Agar bereits bei einer Konzentration von 0,5 g/l den höchsten koloniebegrenzenden Effekt in Verbindung mit einer sehr hohen Wiederfindungsrate auf.

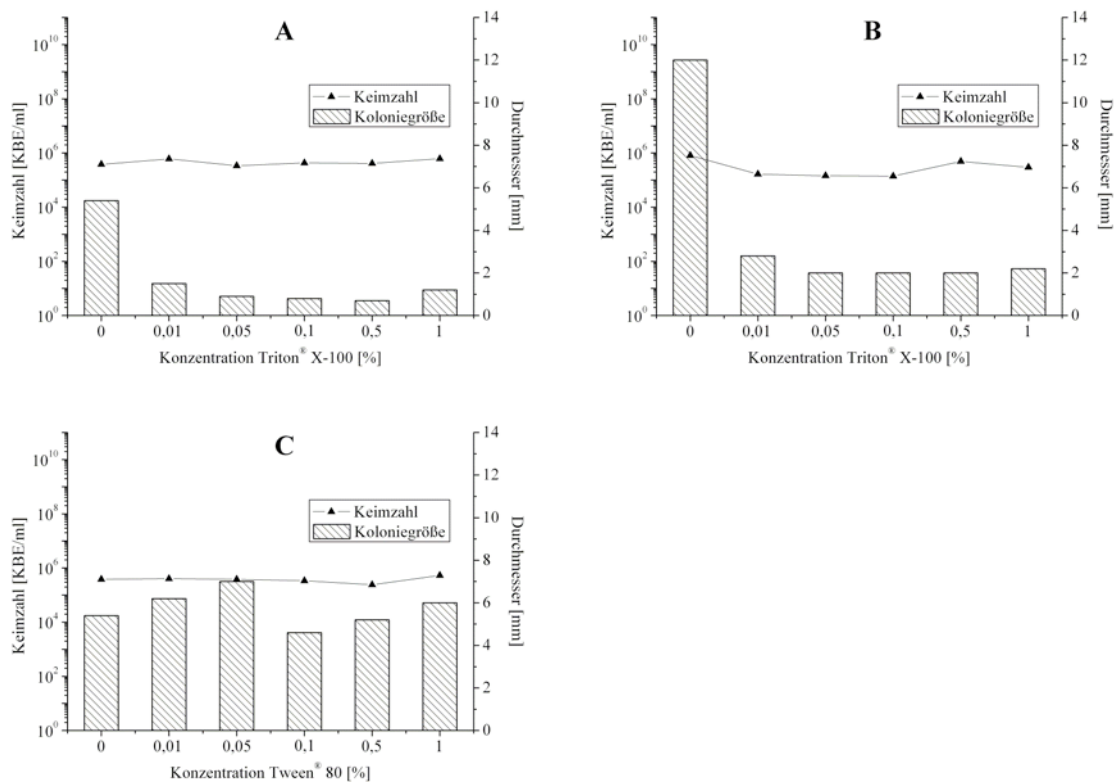


Abb. 20: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 3 h inkubierten *A. niger* Sporensuspension in CASO-Bouillon. A: CASO-Agar mit Triton® X-100; B: Malzextrakt-Agar mit Triton® X-100; C: CASO-Agar mit Tween® 80. Die Bestimmung der Keimzahl und der Koloniegröße erfolgte nach 2-tägiger Inkubation bei 30°C.

Die Kombination aus Malzextrakt-Agar und Triton® X-100 führte ebenfalls zu einer Reduktion der Koloniegröße bei annähernd konstanter Wiederfindungsrate (Abb. 20 B), ist jedoch im Vergleich zu CASO-Agar/Triton® X-100 weniger effektiv. Der Zusatz von Tween® 80 hat keinen Einfluss auf Koloniegröße und Wiederfindungsrate (Abb. 20 C).

Candida albicans

Der ebenfalls den Deuteromyceten zuzuordnende Hefepilz *C. albicans* kommt als pleomorpher Organismus in unterschiedlichen Wachstumsformen vor. Dabei sind einzellige Blastosporen (Hefeform), mehrzellige Pseudohyphen, Chlamydosporen oder Hyphen mögliche Wuchsformen. Die Proliferation der Hefeform erfolgt durch apikale Sprossung und Teilung der Zellen. Werden die Zellen bestimmten Stimuli ausgesetzt (Temperatur, pH-Wert, Nährmedium), kann es zur Ausbildung der anderen genannten Wuchsformen kommen. Die gewählten Wachstumsbedingungen – Anzucht in CASO-Bouillon bei einer Inkubationstemperatur von 30°C – begünstigten jedoch die Hefeform. Da diese genau wie die Bakterienkulturen einzellig vorliegt, war keine abweichende Behandlung erforderlich. Die gewünschte Zelldichte von 10^8 KBE/ml wurde nach ca. 9-16 h erreicht (Abb. 21).

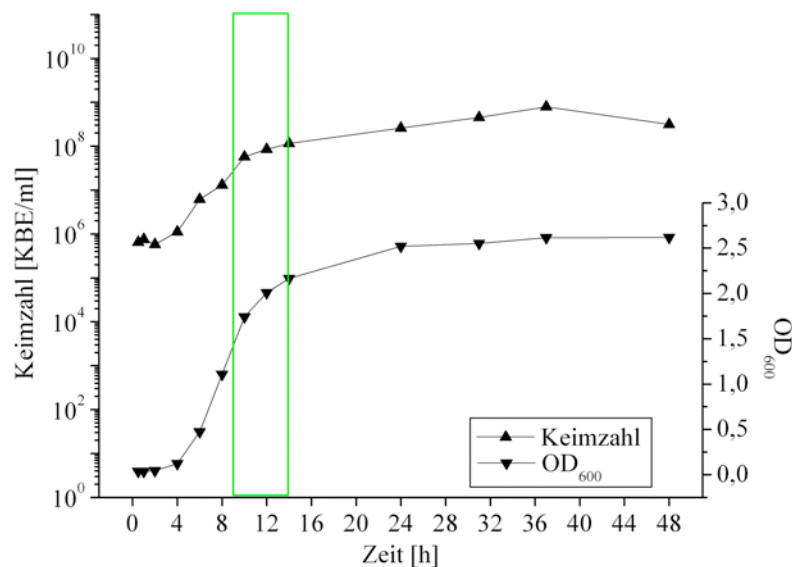


Abb. 21: Wachstumskurve von *C. albicans* bei 35°C in CASO-Bouillon; Balken: Arbeitsbereich für spätere Druckwechselfersuche

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl fanden CASO-Agar, R2A-Agar, Fleisch-Leber-Agar sowie Pseudomonas P-Agar Verwendung. Das Wachstum von *C. albicans* war auf allen betrachteten Nährböden vergleichbar gut (Abb. 22).

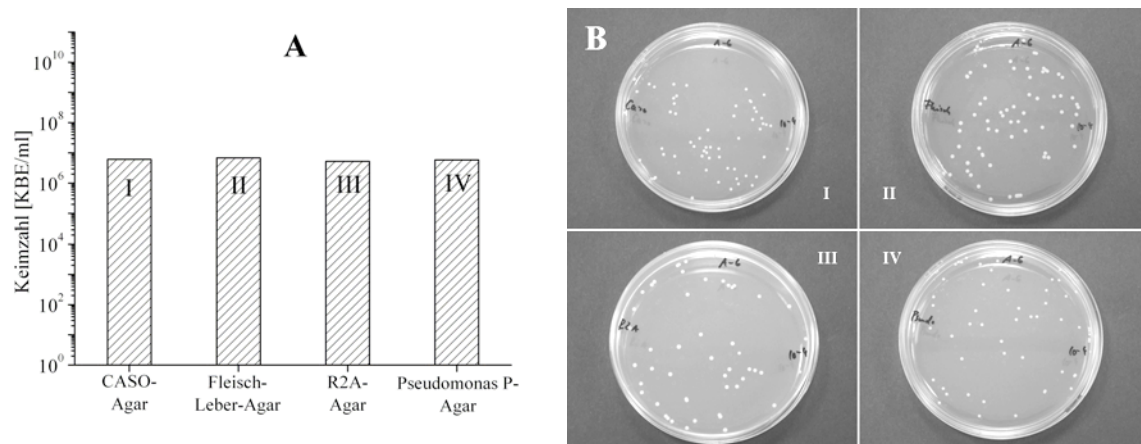


Abb. 22: Prüfung auf Eignung verschiedener Nährmedien anhand einer 6 h inkubierten *C. albicans* Kultur in CASO-Bouillon. A: ermittelte Keimzahl; B: Bewuchs der Agar-Platten nach 36 h Inkubation, Verdünnung: 10^{-4}

2.3.2 BESTIMMUNG DER ZELLGRÖßE

Wie bereits geschildert sind Form und Größe der Mikroorganismenzelle entscheidend für die Länge der Diffusionswege und somit für die Geschwindigkeit des Stoffaustausches mit der Umgebung. Je kleiner die Zellen, desto größer ist die pro Volumeneinheit zur Verfügung stehende Oberfläche. Somit sind kleinere Zellen gegenüber größeren bei der Zufuhr von Nährstoffen und dem Abtransport von Stoffwechselprodukten im Vorteil. Zur Bestimmung der Zellgröße kamen verschiedene mikroskopische Verfahren sowie die Laserdiffraktometrie zum Einsatz. Die untersuchten Mikroorganismen lassen sich in zwei Formgruppen einteilen, in gerade Stäbchen und in Kugeln, die im Folgenden getrennt betrachtet werden.

2.3.2.1 MIKROSKOPISCHE GRÖßENBESTIMMUNG

2.3.2.1.1 STÄBCHENFÖRMIGE MIKROORGANISMEN

Die Größenbestimmung erfolgte retrospektiv anhand der mikroskopischen Aufnahmen im Phasenkontrast, im Hellfeld nach Gramfärbung, nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht und am rasterelektronenmikroskopischen Bild. In Abb. 23 und 24 sind exemplarisch Aufnahmen von *B. atropheus* bzw. *B. diminuta* Kulturen dargestellt. Alle genannten mikroskopischen Verfahren gehen mit einem mehr oder weniger stark ausgeprägten Messfehler einher. Bei der Phasenkontrastmikroskopie sind helle Objekte von einem dunklen Saum umgeben. Eine eindeutige Objektbegrenzung zum umgebenden Medium als Voraussetzung für eine genaue Messung ist somit nicht gegeben. Die Entstehung des Saumes ist auf eine unvollständige Trennung von gebeugtem und

ungebeugtem Licht zurückzuführen und wird in der Literatur als Haloeffekt beschrieben [56].

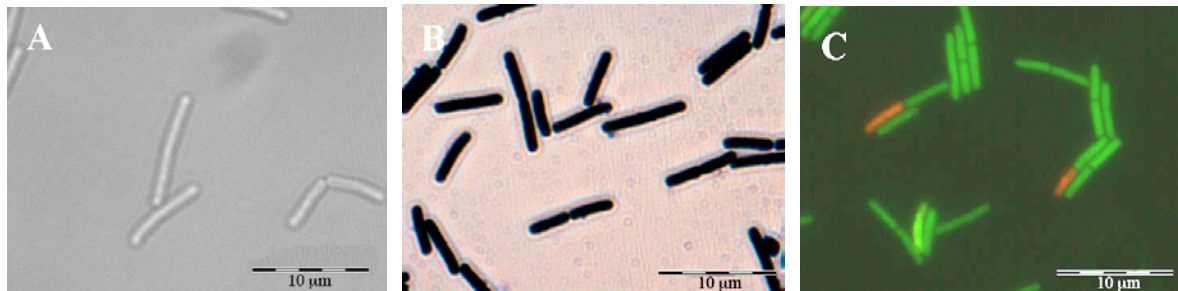


Abb. 23: Mikroskopische Darstellung der Zellen von *B. atropheus* bei 1.000-facher Vergrößerung. A: Phasenkontrast; B: Hellfeld nach Gramfärbung; C: Fluoreszenzlicht nach Live/Dead-Färbung

Die drastischen Präparationsbedingungen bei der Gramfärbung und bei der Proben-
vorbereitung für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen können ein
Schrumpfen der Zellen verursachen und dadurch zu einer Unterschätzung der Zellgröße
führen. Darüber hinaus ist besonders bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen
eine gegenseitige leichte Deformation benachbarter Zellen zu beobachten, was ebenfalls
eine genaue Messung erschwert (Abb. 24). Die nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenz-
licht betrachteten Zellen können wiederum, bedingt durch die Leuchtkraft des Fluoreszenz-
farbstoffes, zu groß erscheinen. Ähnlich den Verhältnissen im Phasenkontrast ist eine
genaue Abgrenzung der Zelle zum umgebenden Medium nicht immer möglich.

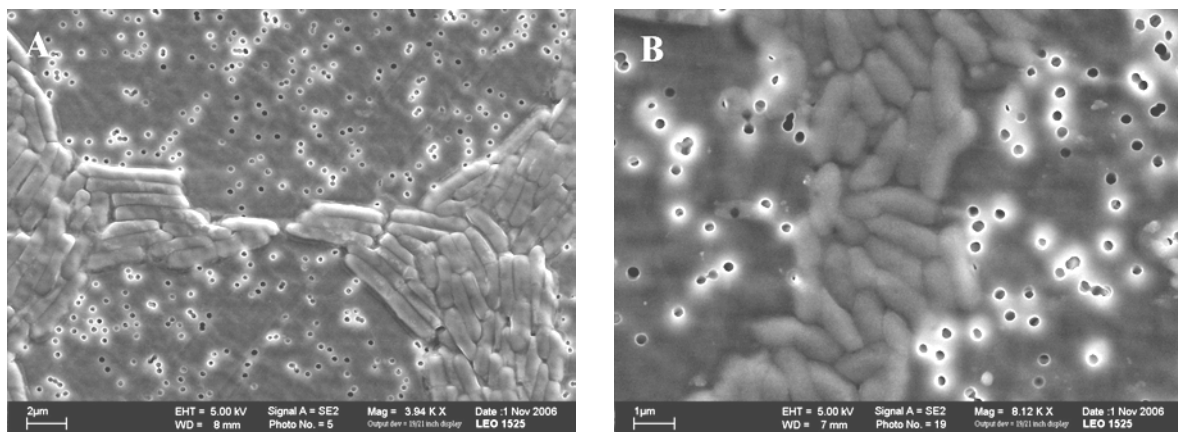


Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. A: *B. atropheus* bei 3.940-facher Vergrößerung; B: *B. diminuta* bei 8.120-facher Vergrößerung, der Balken entspricht 1 µm

Die Größenbestimmung sowie die Berechnung der Zelloberfläche und des Zellvolumens
erfolgten, wie in Kap. 2.2.2.8 beschrieben, näherungsweise durch die Betrachtung der
stäbchenförmigen Bakterienzelle als einen geometrischen Körper, der aus einem geraden
Kreiszyylinder und an den Enden aus zwei deckungsgleichen Halbkugeln besteht. Die
Verwendung des geraden Kreiszyinders als Grundkörper ist möglich, da es sich bei allen

betrachteten Mikroorganismen um gerade Stäbchen handelt (Abb. 25). Eine mögliche schwache Wölbung der Längsseiten bleibt bei dieser Berechnung unberücksichtigt; der daraus resultierende Fehler ist jedoch zu vernachlässigen.

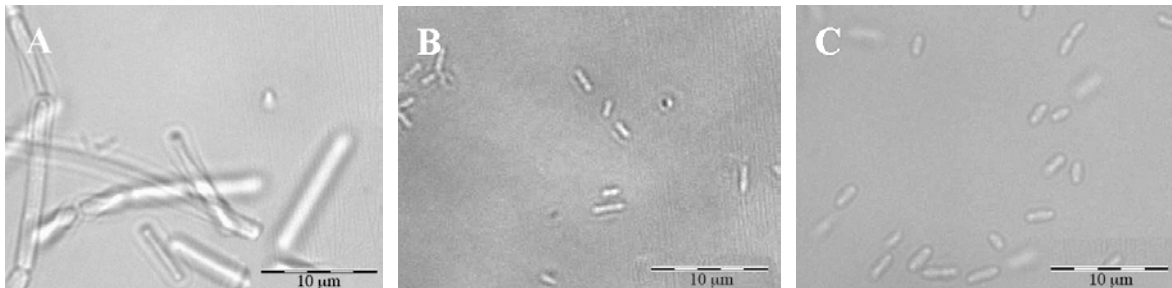


Abb. 25: Vergleich verschiedener Stäbchenformen im Phasenkontrast bei 1.000-facher Vergrößerung. A: *C. sporogenes*; B: *B. diminuta*; C: *P. aeruginosa*

Die Ergebnisse der Größenbestimmung an Einzelkulturen, die daraus berechneten Parameter Oberfläche und Volumen sowie der Quotient aus beiden sind in Tab. 3 dargestellt. Die ebenfalls zu den stäbchenförmigen Bakterien gehörenden Spezies *B. pumilus* und *G. stearothermophilus* waren nicht Gegenstand der mikroskopischen Auswertung.

Je nach Präparations- und Detektionsverfahren weichen die ermittelten Größen aus den genannten Gründen unterschiedlich stark voneinander ab. Die vermutete Überbewertung der Zellgröße nach Live/Dead-Färbung im Vergleich zur Gramfärbung bzw. raster-elektronenmikroskopischen Aufnahme konnte anhand der erhaltenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Ein Trend zu höheren Werten war nur bei der Größenbestimmung im Phasenkontrast erkennbar. Der geringe Stichprobenumfang, gemessen an der Gesamtpopulation, gestattet jedoch keine aussagekräftige statistische Prüfung der Daten. Unabhängig von der Bestimmungsmethode ist aber festzustellen, dass alle Ergebnisse den in der Literatur beschriebenen Größenverhältnissen entsprechen. Für *B. atropheus* sind Größen im Bereich von 0,5-2,5 µm Breite und 1,2-10,0 µm Länge beschrieben. Die Breite der Zellen des Genus *Clostridium* liegt zwischen 0,3 und 2,0 µm und die Länge zwischen 1,5 und 20 µm. *B. diminuta* Zellen sind mit 0,4-0,5 µm Breite und 1-2 µm Länge angegeben und bei *P. aeruginosa* Zellen sind Breiten von 0,5-1,0 µm und Längen von 1,5-5,0 µm publiziert [27, 28].

Die Berechnung des Oberfläche/Volumen-Verhältnisses ergab für *B. diminuta* die größte je Volumeneinheit zur Verfügung stehende Zelloberfläche. Ähnliche Werte weisen auch die Zellen von *P. aeruginosa* auf. Im Vergleich zu *B. atropheus* und *C. sporogenes* ist bei diesen von einem schnelleren Stoffaustausch zwischen Zelle und Medium auszugehen.

Tab. 3: Ermittelte Zellgröße der eingesetzten stäbchenförmigen Mikroorganismen unter Verwendung verschiedener mikroskopischer Verfahren; Einzelkulturen ($\bar{x} \pm s$; n=6 Zellen)

	Methode	h_{Zylinder} [μm]	d_{Zylinder} [μm]	r_{Kugel} [μm]	A [μm^2]	V [μm^3]	A / V
<i>B. atropheus</i>	Phasenkontrast	4,22±1,41	1,28±0,10	0,41±0,08	19,27±6,11	5,84±2,12	3,36±0,27
	Gram	3,58±0,41	1,02±0,07	0,29±0,05	12,55±2,15	3,06±0,74	4,17±0,32
	Live/Dead	2,90±0,84	0,92±0,14	0,34±0,10	10,14±3,94	2,26±1,23	4,81±0,74
	REM	3,38±0,63	0,97±0,09	0,41±0,07	12,52±2,97	2,87±0,92	4,47±0,41
<i>C. sporogenes</i>	Phasenkontrast	3,46±0,62	1,16±0,06	0,42±0,14	14,99±3,07	4,03±0,84	3,73±0,19
	Gram	2,34±0,24	0,93±0,06	0,34±0,04	8,35±1,12	1,78±0,34	4,73±0,31
	Live/Dead	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	REM	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>B. diminuta</i>	Phasenkontrast	1,97±0,22	0,68±0,10	0,25±0,05	4,97±0,94	0,79±0,26	6,51±0,94
	Gram	1,80±0,29	0,44±0,12	0,18±0,03	2,93±1,02	0,33±0,21	10,12±2,64
	Live/Dead	1,81±0,24	0,51±0,10	0,24±0,06	3,70±0,81	0,46±0,17	8,50±1,44
	REM	1,66±0,19	0,77±0,06	0,35±0,05	5,56±0,73	0,96±0,18	5,85±0,40
<i>P. aeruginosa</i>	Phasenkontrast	2,36±0,52	0,94±0,15	0,33±0,10	8,63±3,09	1,95±1,03	4,75±0,72
	Gram	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Live/Dead	1,42±0,21	0,63±0,07	0,18±0,03	3,20±0,38	0,47±0,07	6,92±0,77
	REM	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

h: Höhe, d: Durchmesser, r: Radius, A: Oberfläche, V: Volumen, n.b.: nicht bestimmt

Neben dem Einfluss des mikroskopischen Verfahrens auf die Größenbestimmung der Mikroorganismenzellen wurden auch die Größenverteilungen bei verschiedenen Flüssigkulturen einer Spezies betrachtet. Aus Tab. 4 sind die Ergebnisse von zehn unter gleichen Bedingungen gezüchteten und ausgewerteten *B. atropheus* Kulturen zu entnehmen. Auch hier sind ähnlich den in Tab. 3 dargestellten Ergebnissen, bedingt durch die große biologische Variabilität, deutliche Unterschiede zu erkennen. Insgesamt können jedoch die von der Einzelkultur abgeleiteten Aussagen bestätigt werden.

Tab. 4: Ermittelte Zellgröße verschiedener Kulturen von *B. atropheus* unter Verwendung der Phasenkontrastmikroskopie ($\bar{x} \pm s$; n=6 Zellen; Abkürzungen siehe Tab. 3)

Kultur	h_{Zylinder} [μm]	d_{Zylinder} [μm]	r_{Kugel} [μm]	A [μm^2]	V [μm^3]	A / V
1	4,96 \pm 1,55	1,32 \pm 0,15	0,60 \pm 0,08	25,52 \pm 9,39	8,07 \pm 3,90	3,30 \pm 0,39
2	4,64 \pm 0,64	1,35 \pm 0,14	0,52 \pm 0,10	23,38 \pm 4,86	7,50 \pm 2,34	3,21 \pm 0,35
3	6,39 \pm 1,43	1,47 \pm 0,37	0,49 \pm 0,09	33,13 \pm 10,82	12,34 \pm 6,91	3,01 \pm 0,74
4	7,20 \pm 1,18	1,52 \pm 0,21	0,65 \pm 0,10	40,04 \pm 7,73	14,64 \pm 4,29	2,83 \pm 0,40
5	7,66 \pm 1,99	1,77 \pm 0,28	0,72 \pm 0,13	50,33 \pm 18,62	21,87 \pm 10,77	2,46 \pm 0,43
6	6,96 \pm 1,24	1,34 \pm 0,10	0,54 \pm 0,04	32,70 \pm 4,80	10,37 \pm 1,80	3,17 \pm 0,24
7	6,90 \pm 2,35	1,30 \pm 0,18	0,63 \pm 0,10	33,13 \pm 10,58	10,32 \pm 3,88	3,28 \pm 0,38
8	6,79 \pm 1,52	1,12 \pm 0,21	0,45 \pm 0,14	26,80 \pm 8,36	7,46 \pm 3,39	3,84 \pm 0,67
9	4,66 \pm 0,83	1,71 \pm 0,16	0,66 \pm 0,05	30,24 \pm 4,10	11,79 \pm 2,06	2,59 \pm 0,23
10	6,13 \pm 2,14	1,52 \pm 0,19	0,75 \pm 0,13	37,24 \pm 14,54	13,76 \pm 7,23	2,86 \pm 0,36
Gesamt¹	6,23\pm1,79	1,44\pm0,27	0,60\pm0,13	33,25\pm12,15	11,81\pm6,46	3,05\pm0,56

¹ $\bar{x} \pm s$; n=60 Zellen

2.3.2.1.2 KUGELFÖRMIGE MIKOORGANISMEN

Wie bei den stäbchenförmigen Mikroorganismen erfolgte auch hier die Größenbestimmung retrospektiv anhand der mikroskopischen Aufnahmen. Die möglichen Fehlerquellen sind in Kap. 2.3.2.1.1. beschrieben. Auch bei den kugelförmigen Mikroorganismen war es in einigen Fällen sehr schwierig, eine eindeutige Abgrenzung zwischen Zelle und Medium vorzunehmen; exemplarisch ist dies in Abb. 26 dargestellt.

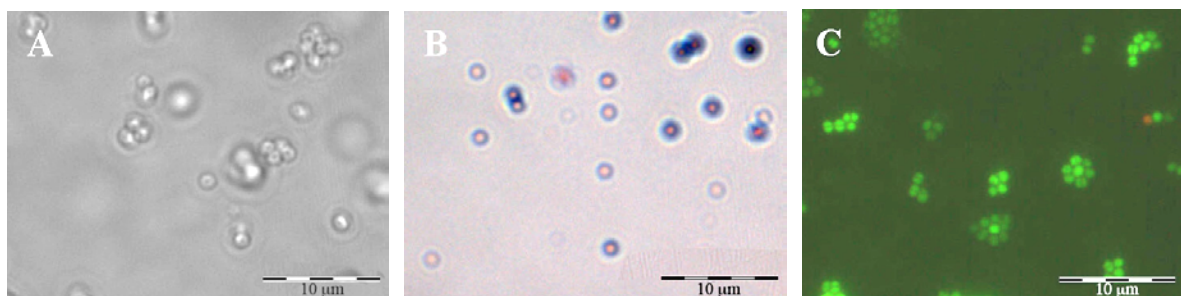


Abb. 26: Mikroskopische Darstellung der Zellen von *S. aureus* bei 1.000-facher Vergrößerung. A: Phasenkontrast; B: Hellfeld nach Gramfärbung; C: Fluoreszenzlicht nach Live/Dead-Färbung

Die untersuchten kugelförmigen Spezies waren vegetative Zellen von *S. aureus*, *C. albicans* und Sporen von *A. niger*. Trotz der in einigen Fällen vorhandenen Abweichung von der idealen Kugelform wurde die Berechnung des Volumens und der Oberfläche unter Annahme der Kugelform durchgeführt (Abb. 27 und 28). Um den daraus resultierenden

Fehler zu minimieren, erfolgte die Bestimmung des Zelldurchmessers nach der statistischen Methode von Feret (vgl. Kap. 2.2.2.8).

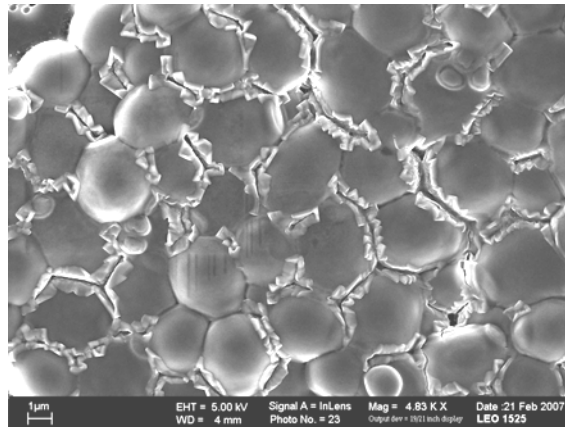


Abb. 27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *C. albicans* bei 4830-facher Vergrößerung

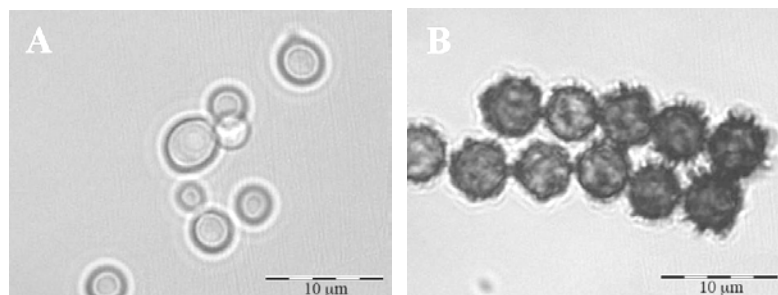


Abb. 28: Vergleich verschiedener Kugelformen im Phasenkontrast bei 1.000-facher Vergrößerung. A: *C. albicans*; B: *A. niger* Sporen

Von den untersuchten kugelförmigen Mikroorganismen wiesen die Zellen von *S. aureus* den geringsten Durchmesser und damit verbunden das günstigste Oberfläche/Volumen-Verhältnis auf. Die Zellen von *C. albicans* sind um den Faktor 3 größer und die Sporen von *A. niger* sind viermal so groß wie *S. aureus* Zellen (Tab. 5). Ausgehend von den für *S. aureus* berechneten Werten verringert sich dadurch die pro Volumeneinheit zur Verfügung stehende Oberfläche um 2/3 bzw. 3/4. Im Vergleich zu den stäbchenförmigen Mikroorganismen resultieren aufgrund der Kugelform bei gleichem Zellvolumen geringere Oberflächen.

Tab. 5: Ermittelte Zellgröße der eingesetzten kugelförmigen Mikroorganismen unter Verwendung verschiedener mikroskopischer Verfahren; Einzelkulturen ($\bar{x} \pm s$; n=6 Zellen; Abkürzungen siehe Tab. 3)

	Methoden	$d_{\text{Kugel}} [\mu\text{m}]$	A [μm^2]	V [μm^3]	A / V
<i>S. aureus</i>	Phasenkontrast	1,22±0,08	4,68±0,62	0,96±0,19	4,94±0,31
	Gram	1,32±0,12	5,47±1,02	1,22±0,34	4,60±0,43
	Live/Dead	0,79±0,08	1,95±0,39	0,26±0,08	7,70±0,66
	REM	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>C. albicans</i>	Phasenkontrast	3,72±0,68	44,69±15,39	29,16±14,09	1,66±0,34
	Gram	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Live/Dead	3,51±0,31	38,99±6,81	23,11±6,01	1,72±0,16
	REM	3,49±0,57	39,12±12,99	23,78±11,98	1,76±0,28
<i>A. niger</i>	Phasenkontrast	4,67±0,32	68,83±9,33	54,00±10,91	1,29±0,09
	Gram	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Live/Dead	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	REM	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

2.3.2.2 LASERDIFFRAKTOMETRIE

Um eine deutliche Erhöhung des Stichprobenumfangs der Mikroorganismenzellen für die Zellgrößenbestimmung zu realisieren, wurden Mikroorganismenkulturen von *B. atrophaeus*, *B. pumilus*, *G. stearothermophilus*, *B. diminuta* und *C. albicans* mittels Laserdiffraktometrie untersucht. Die Anzucht der Kulturen erfolgte jeweils unter den definierten Standardbedingungen. Für die Auswertung der Messungen standen zwei Modi, basierend auf der Fraunhofer- bzw. Mie-Theorie, zur Verfügung. Die Anwendung der Mie-Theorie führt durch die Berücksichtigung des absorbierten, gebrochenen und reflektierten Lichts bei sehr kleinen Partikeln zu aussagekräftigeren Ergebnissen, setzt jedoch sphärische Partikel und die genaue Kenntnis der Materialeigenschaften bezüglich Brechungsindex und Absorptionskoeffizient voraus [57]. Es sollte daher bei unvollständiger Datenlage die Verwendung der parameterfreien Fraunhofer-Theorie bevorzugt werden [58]. Diese erlaubt auf Basis der Beugungsspektren auch eine Bestimmung der Partikelgrößenverteilung bei nicht-sphärischen Partikeln. Da die zu untersuchenden Mikroorganismen, mit Ausnahme der *C. albicans* Zellen, eine stäbchenförmige Gestalt aufweisen und der anisotrope Aufbau unterschiedliche Brechungsindizes innerhalb der Zellen verursacht, erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Fraunhofer-Theorie [59]. Bei nicht-sphärischen Zellen ist jedoch auch hier mit einer Messungenauigkeit zu rechnen [60]. Ein

kritischer Vergleich der Ergebnisse mit alternativen Größenbestimmungen ist daher unerlässlich. Aufgrund des geringen relativen Brechungsindex Mikroorganismus/Wasser besteht darüber hinaus die Gefahr, dass durch sekundäres Streulicht in Vorwärtsrichtung eine zusätzliche Anzahl sehr kleiner Partikel vorgetäuscht wird. Abhilfe könnte die Verwendung eines Streulichtverfahrens, wie die dynamische Laserlichtstreuung, oder die Ultraschallextinktion schaffen [61, 62]. Eine weitere Fehlerquelle liegt in der möglichen Erfassung mehrerer zusammen gelagerter bzw. in Teilung befindlicher Zellen als eine große Zelle. Daraus resultieren wie in Abb. 29 dargestellt, Verteilungen mit zwei Maxima bzw. eine deutliche Schulterbildung im Bereich größerer Partikeldurchmesser. Eine der Messung vorgelagerte Ultraschalldispersierung konnte den Anteil der „Mehrlingszellen“ deutlich reduzieren (vgl. Kap. 2.2.2.8).

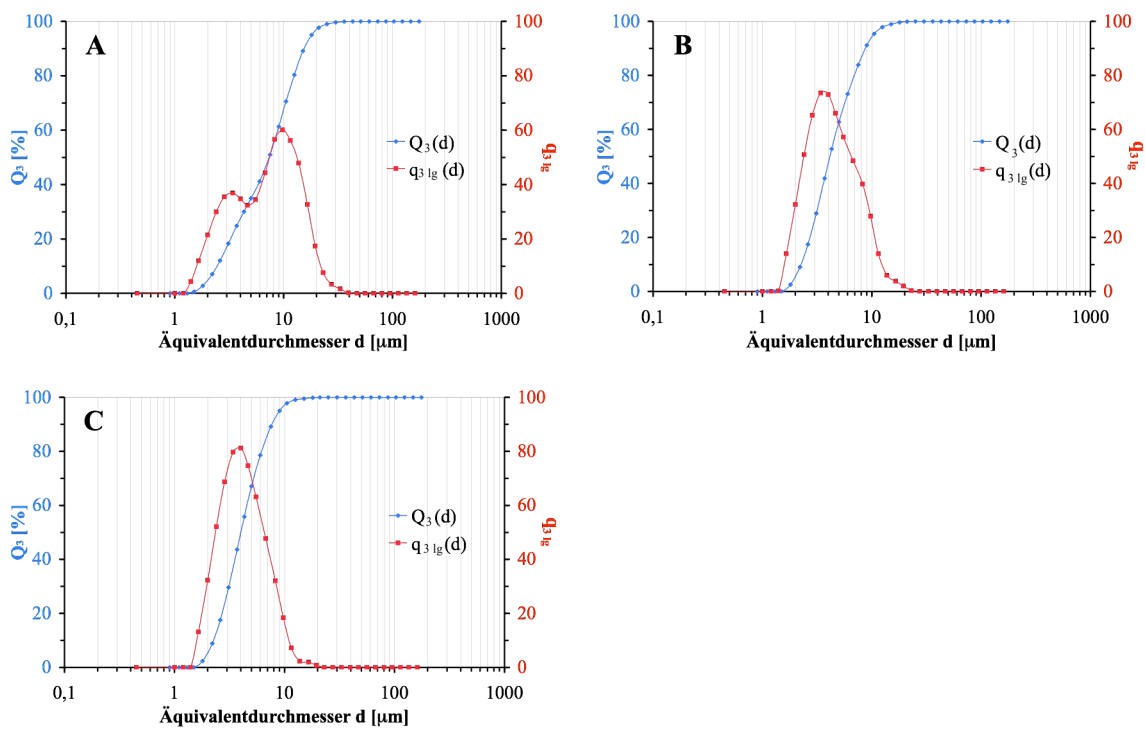


Abb. 29: Verteilungssummenkurven $Q_3(d)$ und Volumendichtungen $q_{3lg}(d)$ einer *C. albicans* Kultur nach 12 h Inkubation bei 30°C und 250 UpM. A: ohne Ultraschalldispersierung; B: nach 60 s Ultraschalldispersierung; C: nach 300 s Ultraschalldispersierung. Die Auswertung der Beugungsspektren erfolgte auf Basis der Fraunhofer-Theorie.

Je Messreihe wurden nur die letzten drei aufeinander folgenden Messungen, also nach maximaler Dispersierungsdauer, bei der Bestimmung des mittleren Partikeldurchmessers berücksichtigt (Tab. 6). In Einzelfällen war es jedoch nicht möglich durch 3 x 60 s und anschließend 3 x 300 s Ultraschalldispersierung eine Auflösung der zusammen gelagerten Zellen herbeizuführen. In diesen Fällen wurde nicht der mittlere Partikeldurchmesser der letzten drei Messungen berücksichtigt, sondern der Mittelwert direkt von der Volumen-

verteilungskurve $q_3 \lg(d)$ abgelesen (Maximum des im Verlauf der Messreihe zunehmenden Peaks).

Tab. 6: Ermittelte Zellgröße der eingesetzten Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; Einzelkulturen, bestimmt mittels Laserdiffraktometrie ($\bar{x} \pm s$; n=3 Messungen)

	Inkubationszeit	$d_{\text{Kugel}} [\mu\text{m}]$	$A [\mu\text{m}^2]$	$V [\mu\text{m}^3]$	A / V	
Stäbchen	<i>B. atrophaeus</i>	4h	1,67±0,06	8,73±0,60	2,43±0,25	3,60±0,13
		8h	1,66±0,06	8,63±0,68	2,39±0,28	3,63±0,14
		12h	1,59±0,01	7,94±0,10	2,10±0,04	3,77±0,02
		24h	1,58±0,01	7,88±0,06	2,08±0,02	3,79±0,01
	<i>B. pumilus</i>	4h	1,40±0,10	6,18±0,88	1,45±0,31	4,30±0,31
		8h	1,56±0,03	7,65±0,29	1,99±0,11	3,85±0,07
		12h	1,33±0,02	5,56±0,17	1,23±0,06	4,51±0,07
		24h	1,30±0,02	5,34±0,13	1,16±0,04	4,60±0,05
	<i>G. stearo-thermophilus</i>	4h	2,49±0,01	19,43±0,09	8,05±0,06	2,41±0,01
		8h	1,85±0,01	10,76±0,12	3,32±0,05	3,24±0,02
		12h	1,46±0,03	6,70±0,28	1,63±0,10	4,11±0,08
		24h	1,50±0,03	7,07±0,25	1,77±0,09	4,00±0,07
	<i>B. diminuta</i>	4h	1,05±0,01	3,46±0,07	0,61±0,02	5,71±0,05
		8h	1,06±0,01	3,51±0,08	0,62±0,02	5,68±0,06
		12h	1,10±0,01	3,78±0,04	0,69±0,01	5,47±0,03
		24h	1,16±0,02	4,25±0,11	0,82±0,03	5,16±0,07
Kugel	<i>C. albicans</i>	4h	3,83±0,06	46,17±1,40	29,51±1,34	1,57±0,02
		8h	3,90±0,10	47,80±2,45	31,10±2,39	1,54±0,04
		12h	4,03±0,02	51,11±0,53	34,36±0,53	1,49±0,01
		24h	3,29±0,01	33,94±0,24	18,59±0,20	1,83±0,01

Die Bestimmung der Zellgrößenverteilung erfolgte an Mikroorganismenkulturen unterschiedlichen Alters. Dazu wurden nach Inkubationszeiten von 4, 8, 12 und 24 h Messungen durchgeführt. Ziel dieser Betrachtung war es, den Einfluss der Wachstumsphase auf die Partikelgrößenverteilung zu bestimmen. Bei jüngeren Kulturen konnte man häufig eine breitere Größenverteilung und einen größeren mittleren Partikeldurchmesser beobachten. Die bereits genannten ursächlichen Effekte, Erfassung in Teilung befindlicher bzw. zusammen gelagerter Zellen als Gesamtpartikel, sind demnach bei jungen Zellpopulationen besonders ausgeprägt. Der Anteil der „Mehrlingszellen“ nimmt mit zunehmendem Alter der Mikroorganismenkulturen deutlich ab. Nach Abschluss der

exponentiellen Wachstumsphase, in Abhängigkeit von der Mikroorganismenkultur nach einer Inkubationszeit von 12 oder 24 h, sind die Partikelgrößenverteilungen nahezu unabhängig vom Grad der vorangegangenen Dispergierung. Dies berücksichtigend, wurden nur die Ergebnisse der 24 h-Kulturen mit den Daten der mikroskopischen Analyse verglichen. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die Vergleichbarkeit der an nicht-sphärischen Partikeln erhobenen Daten auf das berechnete Volumen reduziert ist. Grund hierfür ist das Messprinzip der Laserbeugung. Die ermittelten Werte stellen den Kugeldurchmesser sphärischer Partikel gleicher optischer Eigenschaften dar (Äquivalentdurchmesser d). Das daraus berechnete Volumen entspricht dem des Partikels. Die Partikeloberfläche und somit auch der Quotient aus Oberfläche und Volumen sind von der Partikelform abhängig und damit nicht vergleichbar.

Das mittlere Zellvolumen von *B. atrophaeus* und *B. diminuta* entspricht den Ergebnissen der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen. Im Vergleich zu den lichtmikroskopischen Verfahren sind jedoch aus den bereits genannten Gründen teilweise erhebliche Unterschiede zu erkennen. Die Ergebnisse der annähernd sphärischen *C. albicans* Zellen entsprechen in allen Punkten den bisher getroffenen Aussagen zu Größe, Volumen und Oberfläche. Aber auch hier ist der Grad der Übereinstimmung mit den rasterelektronenmikroskopischen Daten am größten.

2.3.3 THERMISCHE EIGENSCHAFTEN VON ZELLBESTANDTEILEN (DSC)

Die dynamische Differenzkalorimetrie ist eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung thermodynamischer Eigenschaften verschiedenster Materialien. Im Rahmen mikrobiologischer Fragestellungen sind dabei Untersuchungen an ganzen Zellen oder an isolierten Zellbestandteilen denkbar. In der Literatur sind zahlreiche Studien zur Bestimmung der Temperaturresistenz von vegetativen Mikroorganismen sowie deren Dauerformen beschrieben [63-67]. Dabei hat sich für vegetative Mikroorganismen die Betrachtung der Denaturierungstemperaturen ribosomaler Proteine als besonders aussagefähig erwiesen, da in diesem Temperaturbereich ebenfalls eine drastische Verringerung der Überlebensrate zu verzeichnen ist. [5, 68]. Ein ursächlicher Zusammenhang ist sehr wahrscheinlich und die Denaturierungstemperatur der Bakterienribosomen stellt somit die Obergrenze des tolerierten Temperaturbereichs dar [69, 70]. Die Denaturierungstemperatur der zellulären DNA hat keinen Einfluss auf die thermische Stabilität der Zelle, weil die Denaturierung, d.h. die Entfaltung der Doppelhelix, erst bei höheren Temperaturen erfolgt [66]. Auch die thermische Zersetzung vieler

Zellwandbestandteile findet erst bei Temperaturen oberhalb der Denaturierungstemperatur ribosomaler Proteine statt [71-73].

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden Proben von *B. atrophaeus*, *B. pumilus*, *G. stearothermophilus*, *S. aureus*, *B. diminuta*, *P. aeruginosa* und *C. albicans* im Temperaturbereich von 20-100°C untersucht. Die erhaltenen Thermogramme wiesen ausnahmslos endotherme Phasenübergänge 1. Ordnung auf (Abb. 30).

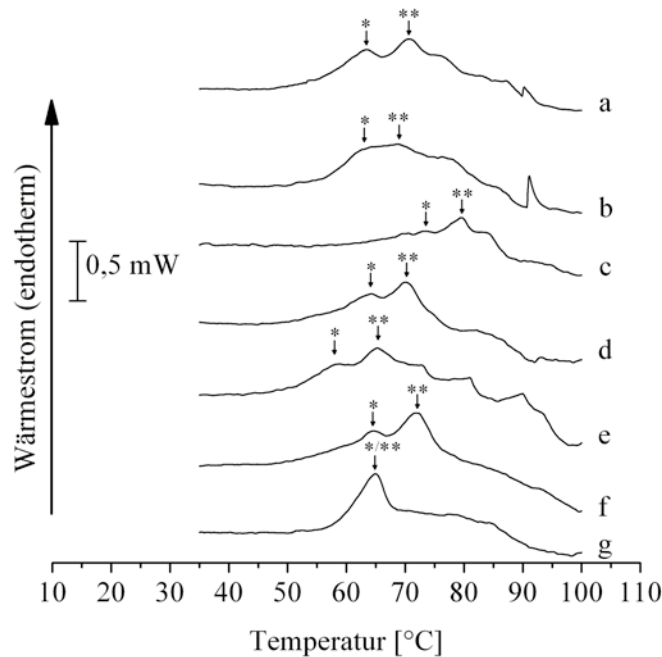


Abb. 30: DSC-Thermogramme vegetativer Zellen von *B. atrophaeus* (a), *B. pumilus* (b), *G. stearothermophilus* (c), *S. aureus* (d), *B. diminuta* (e), *P. aeruginosa* (f) und *C. albicans* (g); Aufheizrate 10°C/min

Ausgewertet wurden jeweils die ersten beiden Peaks im Thermogramm nach Überschreitung einer Temperatur von 40°C. Die im Temperaturbereich von 20-40°C zu erwartenden Schmelzpeaks der Membranlipide wurden nicht berücksichtigt. Alle Bakterien-Thermogramme wiesen im Temperaturbereich von 60-80°C mindestens zwei Peaks auf, wobei der erste Peak (Peak^{*}) hauptsächlich auf die Denaturierung der 30-S Untereinheiten der Bakterienribosomen zurückzuführen ist [71, 74, 75]. Der zweite (Peak^{**}) und die teilweise bis 85°C folgenden Peaks gehen mit der Denaturierung der 50-S Untereinheit und den undissoziierten 70-S Ribosomen einher [71]. Diese Peaks wurden nicht differenziert, sondern summarisch über die Onset-Temperatur des zweiten Peaks betrachtet.

Ein solches Vorgehen war notwendig, da nur selten eine mehr als zweistufige Denaturierung der Ribosomen zu beobachten war. Mit Ausnahme der *G. stearothermophilus* und der *B. diminuta* Zellen erfolgte bei allen Bakterien im Temperatur-

bereich von 59-63°C die Denaturierung der genannten 30-S Untereinheiten (Tab. 7). Die Denaturierung der 50-S Untereinheiten und der 70-S Ribosomen begann bei 67-68°C und erstreckte sich je nach Spezies über einen Bereich von bis zu 15°C. Peaks oberhalb von 90°C sind, wie in der Literatur beschrieben, hauptsächlich auf die Entfaltung der Bakterien-DNA und die Denaturierung von Zellwandbestandteilen zurückzuführen [64].

Tab. 7: Ergebnisse der Onset-Temperatur-Bestimmung in°C der in Abb. 30 gekennzeichneten Peaks ($\bar{x} \pm s$; n=3)

	<i>B. atropheus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. diminuta</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Peak *	60,10±0,91	59,17±0,11	71,36±0,27	61,55±0,52	54,06±0,86	62,48±0,30	-
Peak **	67,52±0,33	67,59±1,32	77,20±0,65	67,09±0,44	62,24±0,01	68,43±0,30	-
Peak */**	-	-	-	-	-	-	60,00±0,16

Die Denaturierung der *B. diminuta* Ribosomen und deren Untereinheiten setzte bereits bei Temperaturen von 54°C ein. Demgegenüber waren bei den wesentlich thermostabileren *G. stearothermophilus* Ribosomen irreversible Phasenübergänge aufgrund von Proteindenaturierungen erst bei Temperaturen > 70°C zu beobachten. Eine Sonderstellung nehmen die Zellen von *C. albicans* ein; als Vertreter eukaryotischer Zellen liegen hier 80-S Ribosomen, bestehend aus 40-S und 60-S Untereinheiten, vor. Eine auch hier zu erwartende gestaffelte Denaturierung war nicht zu erkennen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch den hohen Anteil ribosomaler Proteine am Gesamtgewicht der Zelle (ca. 25 %) die betrachteten Phasenübergänge sehr deutlich zu erkennen waren. Dabei wiesen *B. diminuta* Zellen die höchste und *G. stearothermophilus* Zellen die geringste Thermosensitivität der betrachteten Mikroorganismen auf. Darüber hinaus waren keine deutlichen Unterschiede im thermischen Verhalten der untersuchten Bakterien zu erkennen.

2.3.4 MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN VON MIKROORGANISMENZELLEN (AFM)

Zur Bestimmung mechanischer Eigenschaften von Zellen wurden in den vergangenen zwei Jahrzehnten eine Vielzahl von Methoden entwickelt. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Bestimmung der Zellwandeigenschaften durch die Mikropipettentechnik, die Mikromanipulation durch Zellkompression sowie die Rasterkraftmikroskopie [30, 76-80]. Die Mikropipettentechnik basiert auf der Aspiration eines durch die Pipettenöffnung definierten Zellwandareals. Die definierte Aspirationskraft und das Ausmaß der Verformung ermöglichen Rückschlüsse auf die elastischen Zellwandeigenschaften. Bei der Mikromanipulation durch Zellkompression werden einzelne Zellen zwischen zwei

parallelen Flächen komprimiert und die Kraft als Funktion der Zelldeformation ausgewertet. Im Vergleich zur Mikropipettieretechnik ist dadurch eine gleichmäßigere Belastung der gesamten Zelle möglich.

In der Rasterkraftmikroskopie kann durch das Abtasten der Oberfläche mittels einer Cantilever-Spitze ein Bild von der Oberflächentopographie erzeugt werden; dabei werden die zwischen Cantilever-Spitze und Oberfläche entstehenden attraktiven oder repulsiven Kräfte zur Visualisierung genutzt (Abb. 31 und 32). Um ein möglichst breites Spektrum an Mikroorganismen abzudecken, wurde für die im Folgenden dargestellten rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen je ein Vertreter der gramnegativen (*B. atropheus*) und grampositiven Bakterien (*B. diminuta*) sowie ein Pilz (*A. niger*) ausgewählt.

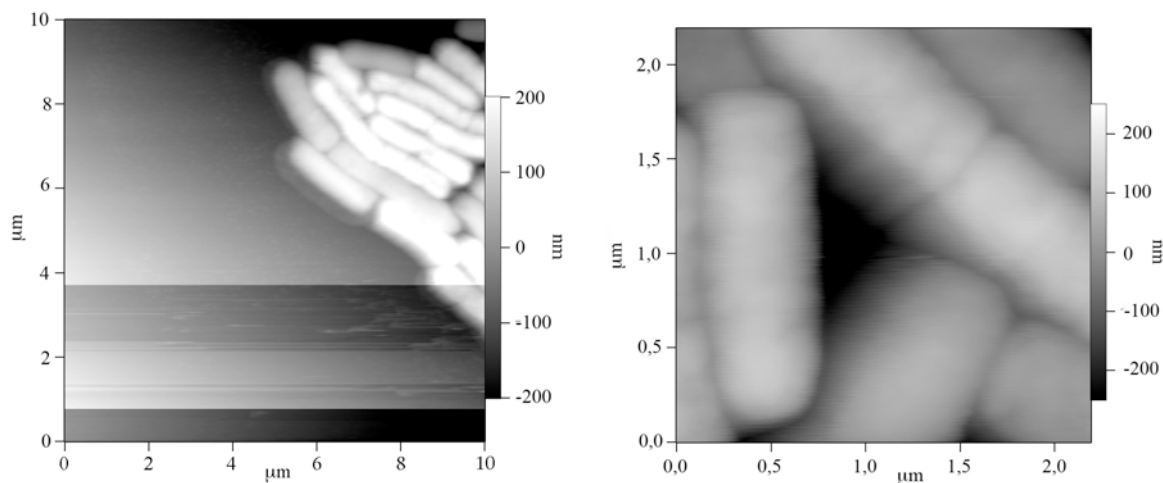


Abb. 31: AFM-Bilder von *B. atropheus* Zellen in Luft bei unterschiedlicher Auflösung, aufgenommen im Constant-Force-Mode. Die Präparation der Zellen erfolgte auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern.

Die Aufnahme der AFM-Bilder erfolgte direkt nach dem Antrocknen der Zellsuspensionen auf den Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern (vgl. 2.2.2.10). Die so realisierten starken Haftkräfte zwischen den Zellen und dem Objektträger erlaubten eine sehr hohe Bildauflösung ohne Unschärfen. Die starken Haftkräfte waren notwendig, um die während des AFM-Scans auftretenden lateralen Kräfte zu kompensieren und somit eine Lageveränderung der Zellen zu vermeiden. Darüber hinaus waren bei Messungen an der Luft die morphologischen Eigenschaften der Probe besser zu erkennen, weil im Vergleich zu Messungen in flüssigem Medium geringere Adhäsionskräfte wirken [54]. Ein Vorteil rasterkraftmikroskopischer Aufnahmen gegenüber lichtmikroskopischen Aufnahmen ist der zusätzliche Informationsgewinn über die genauen Dimensionen des abgebildeten Objektes. Wie in Abb. 32 dargestellt, konnte neben der Länge und Breite der Zellen auch deren Höhe bestimmt werden. An dieser Stelle wirkte sich jedoch die Präparationsmethode durch

Antrocknen der Zellen auf dem Objektträger negativ aus. Im Vergleich zu den in isotoner Kochsalzlösung untersuchten Zellen war eine deutliche Höhenabnahme durch Wasserverlust zu verzeichnen. Mit fortschreitendem Alter der Präparate (0,5-2 h) wurde dieser Effekt noch verstärkt.

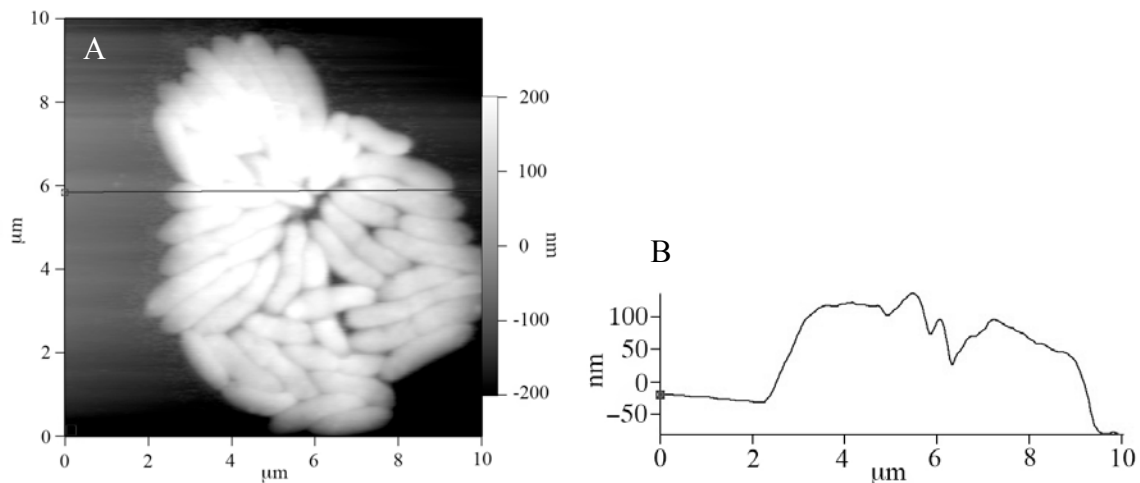


Abb. 32 A: AFM-Bild von *B. diminuta* Zellen in Luft, aufgenommen im Constant-Force-Mode. Die Präparation der Zellen erfolgte auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern. **B:** Höhenmessung entlang der im Bild A dargestellten Strecke

Die erzeugten Bilder entsprechen, bedingt durch ähnliche Präparationstechniken, den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. In beiden Fällen ist es gelungen, bei *B. atrophaeus* Zellen teilungsaktive Zonen darzustellen. Eine artefaktarme Darstellung des *A. niger* Myzels ist leider nicht gelungen. Es ist hier jedoch im Vergleich zu anderen mikroskopischen Methoden auch kein nennenswerter Informationsgewinn durch die rasterkraftmikroskopische Darstellung der Zellen zu erwarten.

Neben der Möglichkeit der Abbildung des Untersuchungsgegenstandes erlaubt die Rasterkraftmikroskopie auch die Aufnahme statischer Kraft-Abstand-Kurven. Dabei wird der ruhende Cantilever durch eine Vertikalbewegung des Piezo-Scanners (vgl. Abb. 3 A) der Substratoberfläche angenähert und im weiteren Verlauf in diese eingedrückt. Dabei kann dessen Verbiegung in Abhängigkeit von der Scannerposition gemessen werden. Nach dem Hook'schen Gesetz ergibt sich bei bekannter Federkonstante aus der Cantilverbiegung die Kraft zwischen Spitze und Probe und die entsprechende Kraftkurve kann erzeugt werden. Für die durchgeführten Versuche typische Kraftkurven sind in Abb. 33 A und B dargestellt.

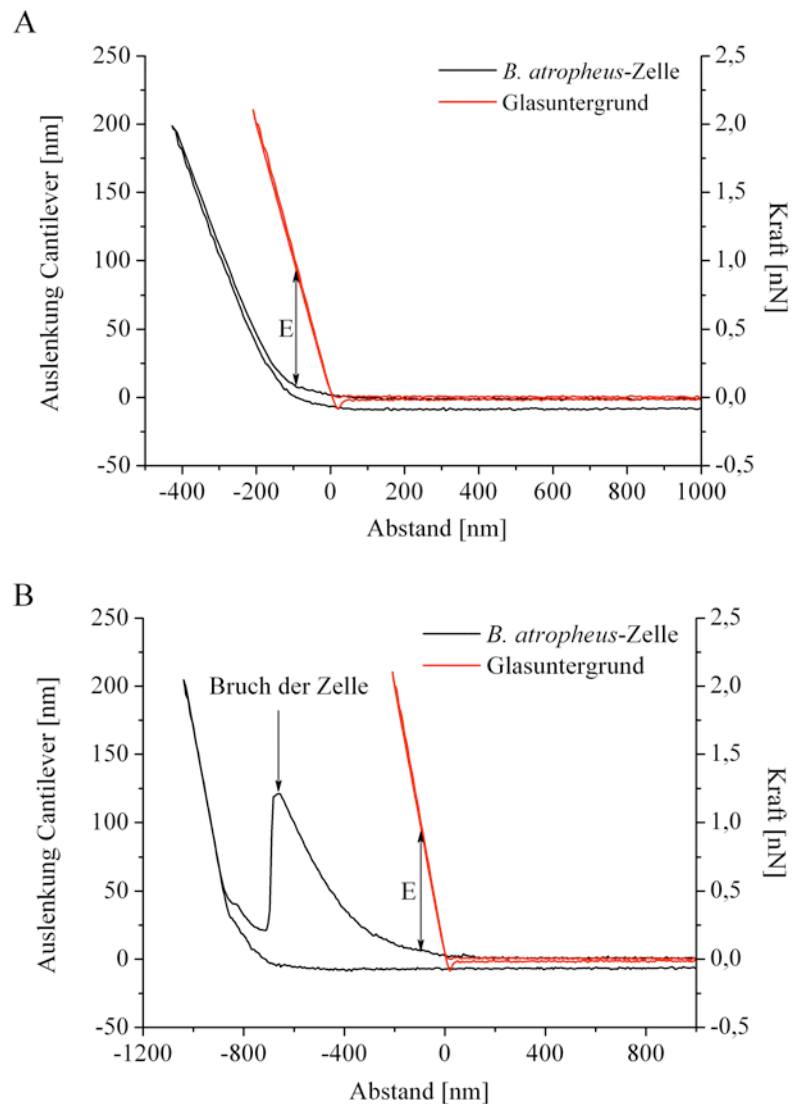


Abb. 33: Auftragung der Cantilerverauslenkung und der resultierenden Kraft gegen den Abstand Probe/AFM-Spitze. **A:** ohne Zerstörung der Zelle; **B:** mit Zerstörung der Zelle (Federkonstante des Cantilevers: 10 mN/m; E: Eindringtiefe der AFM-Spitze)

Jede Kraftkurve ist dabei aus einer Annäherungs- und einer Rückzugkurve zusammengesetzt. Die rot eingezeichneten Kraftkurven entsprechen dem harten Glasuntergrund. Da in diesem Fall die Spitze nicht in die Probe eindringt, ist nach dem Erreichen des Kontaktpunktes die Cantilerverbiegung der Änderung der Piezo-Auslenkung äquivalent und die Kraftkurve weist in diesem Bereich eine Steigung von -1 auf. Die negative Auslenkung des Cantilevers nach dem Unterschreiten des Kontaktpunktes (Rückzugkurve) entspricht der Adhäsionskraft zwischen Spitze und Glasoberfläche. Wird diese durch eine weitere Entfernung des Piezo-Scanners überkompensiert, springt der Cantilever in seine Gleichgewichtslage zurück. Bei der Vermessung der deutlich weicheren Bakterienzellen dringt die Spitze in die Probe ein und es ergibt sich ein flacherer

Kurvenverlauf. Die Differenz der Cantileverauslenkung Glas/Bakterienzelle bei gleichem Piezo-Abstand ergibt die Eindringtiefe der Spitze in die Zelle (Abstand E in Abb. 33).

Die auf den Bakterienoberflächen erzeugten Kraftkurven lassen sich in zwei Gruppen einteilen, Kraftkurven mit und ohne Zerstörung der vermessenen Zelle. Diese gleichen sich zunächst in ihrem nicht-linearen Kurvenverlauf nach Überschreiten des Kontaktpunktes. Mehrere Faktoren sind dafür verantwortlich. Zum einen vergrößert sich mit zunehmender Eindringtiefe die Kontaktfläche zwischen Probe und Spitze; somit nimmt die je Flächeneinheit beaufschlagte Kraft nicht linear zu. Zum anderen kann bei fortschreitender Belastung aufgrund struktureller Neuordnung bzw. ansteigendem intrazellulären Druck eine Versteifung der Zelle einsetzen. Bei dünnen Proben, wie den Bakterienzellen, besteht darüber hinaus die Gefahr, dass die harte Unterlage die Messung beeinflusst. Besonders deutlich wird dies bei Kraftkurven mit einhergehender Zerstörung der Zelle (Abb. 33 B). Nach dem Überschreiten eines lokalen Maximums (Bruch der Zelle) kommt es im weiteren Verlauf der Annäherung wieder zu einem Anstieg der Kraft. Der zunächst nicht-lineare Anstieg geht in einen linearen, mit dem des Glasuntergrundes vergleichbaren, Anstieg über. Der nicht-lineare Bereich ist dabei auf das Vorhandensein der leeren Bakterienhülle zurückzuführen. Mithilfe einer zweiten Vermessung desselben Probenareals konnte verifiziert werden, dass es sich bei den Kraftkurven mit lokalem Maximum tatsächlich um eine Zerstörung der Zelle handelt. Vergleiche der kartierten Kontaktpunkte konnten einen durch Verschieben der Zelle bedingten Kraftabfall ausschließen.

Die Probenpräparation erfolgte nach der in Kap. 2.2.2.10 beschriebenen Methode. Unter Verwendung eines Lichtmikroskops wurde im Anschluss die Auswahl und Positionierung des geeigneten Bakterienzellkollektivs unter der AFM-Einheit vorgenommen. Die anschließende AFM-Messung erfolgte jeweils in einem 20 μm x 20 μm großen Bereich, wobei im Abstand von 1 μm statische Kraftkurven erzeugt wurden. Für die weitere Auswertung waren nur solche Kraftkurven von Interesse, welche durch ein Aufdrücken der Cantileverspitze auf die Zelle von oben erzeugt worden sind. Über die Steigung der Kraftkurven konnten zunächst jene ausgeschlossen werden, welche auf dem harten Glasuntergrund entstanden sind. Um die Zahl der relevanten Kraftkurven weiter einzugrenzen, wurden die Steigungen und die dazugehörigen Probenhöhen (Kontaktpunkt Untergrund – Kontaktpunkt Probe) der verbliebenen Kraftkurven betrachtet (Abb. 34). Ausgehend von den in Kap. 2.3.2 dargestellten Ergebnissen wurden folgende Probenhöhen (Zelldurchmesser) als repräsentativ betrachtet: *A. niger* 2-5 μm ; *B. atrophaeus* 0,6-1,4 μm und *B. diminuta* 0,3-0,8 μm . Alle anderen Probenhöhen ließen auf einen nicht-mittigen

Kontakt der Cantileverspitze auf die Bakterienoberfläche bzw. auf nicht-einschichtig und gleichmäßig auf dem Objektträger liegende Zellen schließen und waren somit nicht von Interesse. Die Verteilung aller, nicht auf dem Glasuntergrund erzeugter, Probenhöhen verifizierte bei zwei von drei der untersuchten Keime die angenommenen Grenzen. Bei den untersuchten *B. atropheus* Zellen lagen die meisten Kontaktpunkte im Bereich von 1 μm und bei *B. diminuta* Zellen im Bereich von 0,5 μm . Einzig die Verteilung der *A. niger* Kontaktpunkte ließ keine Tendenz erkennen, was auf die Unregelmäßigkeit des Myzels zurückzuführen war. Um bei zukünftigen AFM-Messungen an Mikroorganismenzellen die aufwändige Datenanalyse zu vereinfachen und die Streuung der Daten zu verringern, wäre die Verkleinerung des Scan-Bereichs (einzelne Zelle) bei gleichzeitiger Erhöhung der Datenpunkte/ μm^2 sinnvoll.

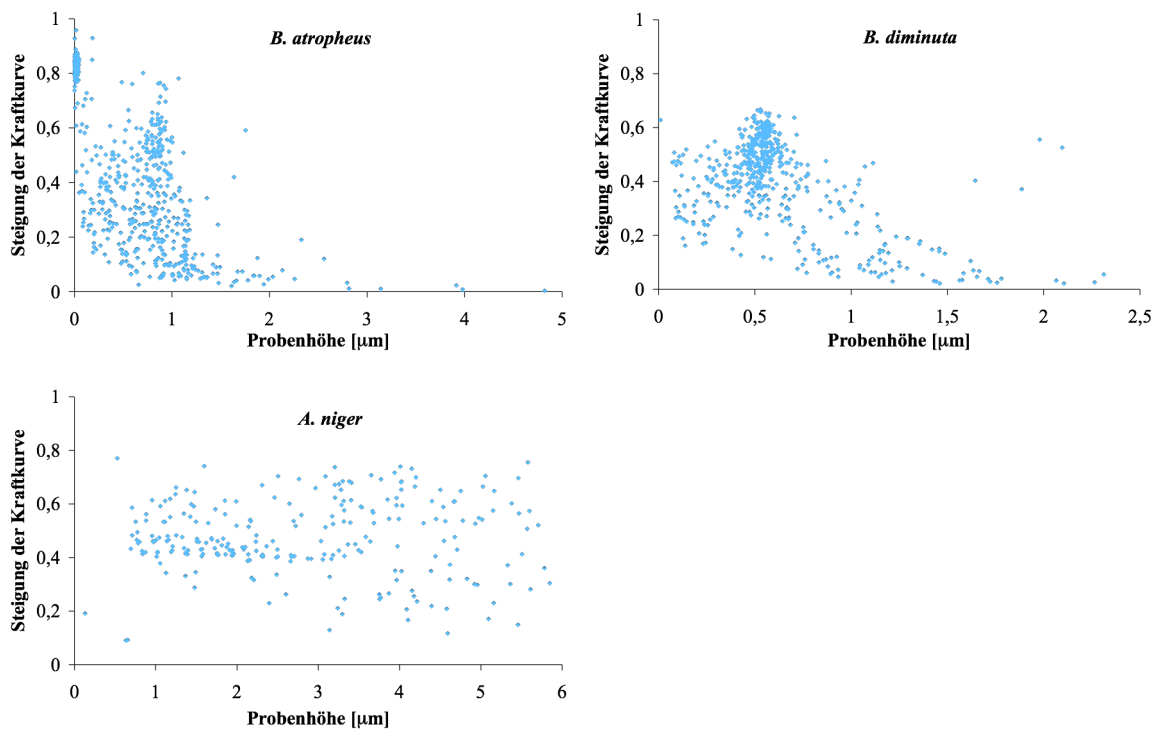


Abb. 34: Probenhöhe und resultierender Anstieg der Kraftkurve aller ausgewerteten Messpunkte. Die Messpunkte des Glasuntergrundes (Probenhöhe = 0 μm ; Steigung = 1) sind nicht dargestellt.

Die Aufnahme der *B. atropheus* Kraftkurven erfolgte bei zwei unterschiedlichen maximalen Cantileverauslenkungen (40 und 200 nm). Durch die Federkonstante des Cantilevers von 10 mN/m ergaben sich dabei Maximalkräfte von 0,4 bzw. 2,0 nN. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Eindringtiefen der Cantileverspitze in die Bakterienzellen erlaubten einerseits den Einfluss des unter der Zelle befindlichen harten Objektträgers auf die Kraftkurve abzuschätzen und andererseits das Ausmaß der Zellzerstörung zu variieren. Der Vergleich der erhaltenen *B. atropheus* E-Module (Tab. 8

und 9) ergab bei größerer Maximalkraft deutlich höhere Werte. Da bis auf die Maximalkraft alle Versuchsbedingungen konstant geblieben sind, kann dieser deutliche Unterschied nur auf eine Dehnungshärtung der Bakterienzellen während der Messung bzw. den Einfluss des harten Glasuntergrundes zurückzuführen sein. Durch die Steigerung der Maximalkraft auf ein fünffaches des ursprünglichen Wertes (von 0,4 auf 2,0 nN) war es möglich, den Anteil der zerstörten Zellen von 7 % (n=231) auf 43 % (n=58) zu erhöhen. Die Steigerung der Maximalkraft ist somit zwar ungeeignet für die Bestimmung des E-Moduls, aber zur Bestimmung der Bruchkraft durchaus sinnvoll. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in diesen Fällen keine sichere Aussage über die maximale Druckbelastung getroffen werden kann, weil die zur Berechnung notwendige Kontaktfläche Cantileverspitze/Zelloberfläche nur mithilfe des E-Moduls bestimmt werden kann.

Tab. 8: Auswertung der Kraftkurven zerstörter Zellen nach dem Hertz-Modell, vgl. Kap. 2.2.2.10 ($\bar{x} \pm s$; n=Anzahl der Durchbrüche)

	max. Cantilever- auslenkung [nm]	Anteil an Durchbrüchen	Anstieg der Kraftkurve [N/m]	Steifigkeit [mN/m]	E-Modul [MPa]	max. Druck- belastung [bar]
<i>B. atropheus</i>	200	25 von 58	0,31±0,16	5,8±6,5	5,1±5,7	1,6±1,8
<i>B. atropheus</i>	40	15 von 231	0,09±0,05	1,0±0,6	0,9±0,5	0,3±0,2
<i>B. diminuta</i>	40	11 von 385	0,09±0,08	1,1±1,1	1,9±1,9	0,6±0,6

Der im Vergleich zu den *B. atropheus* Zellen deutlich geringere Zelldurchmesser bei *B. diminuta* erlaubte bei der Aufnahme der Kraftkurven nur eine maximale Cantileverauslenkung von 40 nm. Der Anteil der zerplatzten *B. diminuta* Zellen lag bei 3 % (n=385) und somit um die Hälfte niedriger als bei den vergleichbaren *B. atropheus*-Zellen. Die darüber hinaus tendenziell höheren Werte für die berechneten E-Module von *B. diminuta* Zellen legen die Vermutung nahe, dass eine höhere Festigkeit der Zellen (abgeleitet aus dem E-Modul) mit einem höheren mechanischen Schutz einhergeht. Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht bestätigt werden. Wie Abb. 35 zu entnehmen ist, wiesen die meisten zerstörten Zellen eine sehr ähnliche Steifigkeit auf; die Kraft die zur Zerstörung der Zellen benötigt wurde, variierte jedoch erheblich. Bemerkenswert ist, dass die untersuchten gramnegativen *B. diminuta* Zellen trotz der wesentlich dünneren Peptidoglycan-Stüttschicht eine deutlich größere mechanische Belastung tolerieren als die grampositiven *B. atropheus* Zellen. Auch die höhere Festigkeit der gramnegativen Zellen ist morphologisch nicht zu erklären.

Für die spätere Beurteilung der Druckwechselergebnisse sind besonders die von den Zellen tolerierten Maximaldrücke bzw. die minimalen Berstdrücke von Interesse. Diese lassen sich

aus der Bruchkraft und der Kontaktfläche zwischen Cantileverspitze und Zelloberfläche ableiten. Für die Untersuchungen an den *B. atropheus* Zellen bedeutet dies, dass im Mittel ca. 7 % der Zellen bei einer Druckbelastung von 0,3 bar zerplatzen. Im Vergleich dazu sind durchschnittlich 0,6 bar notwendig um 3 % der *B. diminuta* Zellen zu zerstören. *A. niger* Zellen konnten unter den gewählten Bedingungen nicht zerstört werden. Bei den nicht-zerstörerischen Messungen konnte unter Zuhilfenahme der applizierten Maximalkraft nur eine Aussage über die tolerierten Drücke getroffen werden (Tab. 9). So halten ca. 93 % der *B. atropheus* Zellen im Mittel einem Druck von 1,8 bar stand. Demgegenüber ist ein Druck von 5,4 bar für 97 % der *B. diminuta*-Zellen tolerabel. Alle *A. niger* Zellen erwiesen sich bei einer mittleren Druckbelastung von 4,6 bar als stabil. Für eine sichere Zerstörung der Zellen sind somit Drücke jenseits der genannten Grenzen notwendig.

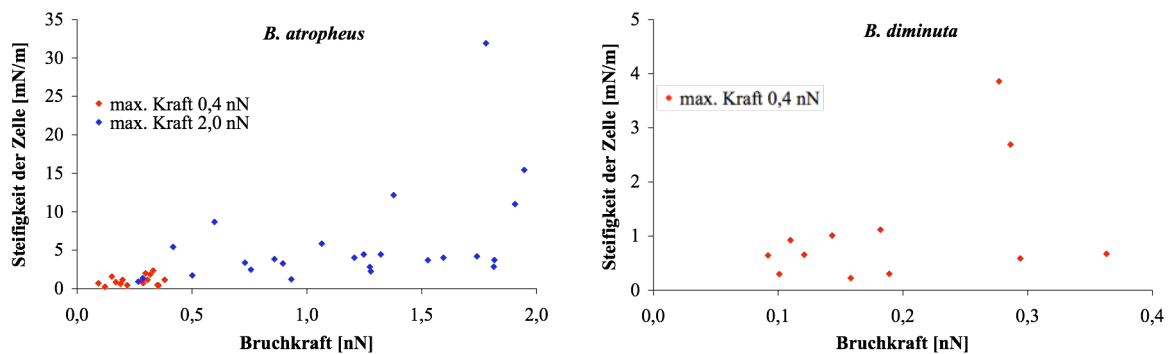


Abb. 35: Abhängigkeit der Steifigkeit der Zellen von *B. atropheus* und *B. diminuta* von der Bruchkraft in isotoner Natriumchlorid-Lösung

Unter Berücksichtigung der Zellgröße und des Zellwandaufbaus der *A. niger* Zellen erfolgte die Aufnahme der Kraftkurven immer bis zu einer maximalen Cantileverauslenkung von 200 nm. Wie bereits ausgeführt, war es trotz der vergleichsweise hohen Maximalkräfte nicht möglich, einzelne Zellen zu zerstören. Da ein Einfluss des harten Untergrundes auf die erzeugten Kraftkurven durch die Zelldicke von 2-5 μm ausgeschlossen werden konnte, war im Gegensatz zu den unter gleichen Bedingungen gewonnenen *B. atropheus* Daten, ein direkter Vergleich der berechneten Steifigkeiten und der E-Module mit den Bakteriendaten bei 40 nm maximaler Cantileverauslenkung möglich. Die elastischen Eigenschaften der *B. diminuta* Zellen entsprachen dabei denen des Pilzes; die Ergebnisse der *B. atropheus* Zellen (Maximalkraft 0,4 nN) ließen auf eine vergleichsweise weiche Hülle schließen (Tab. 9). Eine abschließende Bewertung der erhaltenen Ergebnisse war durch die große Streuung der Daten jedoch erschwert.

Tab. 9: Auswertung der Kraftkurven nicht zerstörter Zellen nach dem Hertz-Modell ($\bar{x} \pm s$; n=Anzahl der Messpunkte)

	max. Cantileverauslenkung [nm]	Anzahl Messpunkte	Anstieg der Kraftkurve [N/m]	Steifigkeit [mN/m]	E-Modul [MPa]	max. Druckbelastung [bar]
<i>A. niger</i>	200	133	0,48±0,15	11,0±6,6	14,4±8,6	4,6±2,8
<i>B. atropheus</i>	200	33	0,48±0,19	12,5±10,5	11,0±9,3	3,5±3,0
<i>B. atropheus</i>	40	216	0,33±0,19	6,3±5,4	5,6±4,7	1,8±1,5
<i>B. diminuta</i>	40	374	0,47±0,11	9,6±3,9	17,0±6,9	5,4±2,2

Zur besseren Bewertung der erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 10 Daten bereits publizierter rasterkraftmikroskopisch untersuchter Mikroorganismen dargestellt. Es wird dabei deutlich, dass die Präparationsmethode einen erheblichen Einfluss auf die dargestellten Parameter besitzt. Die unter vergleichbaren Bedingungen gewonnenen Daten zum grampositiven Keim *S. aureus* entsprechen den eigenen Ergebnissen des ebenfalls grampositiven Keimes *B. atropheus*. Auch die Daten der gramnegativen Vertreter *E. coli*, *M. gryphiswaldense* und *P. aeruginosa* entsprechen denen von *B. diminuta* Zellen.

Tab. 10: Literaturdaten zu rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen an Mikroorganismenzellen bzw. deren Hüllen

Spezies	Besonderheit	Turgor [kPa]	Steifigkeit [mN/m]	E-Modul [MPa]	Literatur
<i>A. nidulans</i>	in Nährmedium	n.b.	290±20	110±10	[6]
<i>A. nidulans</i>	Kaliumchlorid-Zusatz (0,6 mol/l)	n.b.	170±10	64±4	[6]
<i>A. nidulans</i>	Sporen	n.b.	110.000±10.000	6.600±400	[49]
<i>E. coli</i>	Sacculus	n.b.	n.b.	15-60	[81]
<i>M. gryphiswaldense</i>		85-150	40±10	n.b.	[47, 48]
<i>M. hungatei</i>	Sacculus	n.b.	n.b.	33.000-39.000	[82]
<i>P. aeruginosa</i>	in Nährmedium	15-22	20-30	n.b.	[34]
<i>P. aeruginosa</i>	in demin. Wasser	190	260	n.b.	[34]
<i>S. cerevisiae</i>		n.b.	n.b.	0,6±0,4	[26]
<i>S. cerevisiae</i>	Knospungsnarbe	n.b.	n.b.	6,1±2,4	[26]
<i>S. cerevisiae</i> *	exponentielle Wachstumsphase	n.b.	n.b.	112±6	[79, 80]
<i>S. cerevisiae</i> *	stationäre Wachstumsphase	n.b.	n.b.	107±6	[80]
<i>S. aureus</i>		n.b.	13±1	1,8±0,2	[31]

*Bestimmung erfolgte mittels Mikromanipulationstechnik

Ein Vergleich der elastischen Eigenschaften gramnegativer Zellen mit denen grampositiver Zellen, ergibt, ebenso wie bei den eigenen Untersuchungen, für gramnegative Zellen eine höhere Steifigkeit bzw. ein höheres E-Modul.

Die mit *A. niger* gewonnenen Daten konnten nicht durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden. Die publizierten *A. nidulans* Ergebnisse wiesen 5 bis 10-fach höhere Werte für die berechneten E-Module auf [6, 49]. Die beobachteten Abweichungen zwischen den eigenen Messdaten und den Literaturdaten lassen sich eventuell durch Unterschiede zwischen den beiden Vertretern der Gattung *Aspergillus* erklären.

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus den vorangegangenen Untersuchungen liegt darin, dass innerhalb einzelner Zellen Regionen mit unterschiedlicher Festigkeit existieren. Versuche von Touhami et al. belegen, dass im Bereich der Knospungsnarben von Hefezellen deutlich höhere E-Module zu messen sind als außerhalb dieser Regionen [26]. Dagegen konnte kein Einfluss der Wachstumsphase auf die Festigkeit der Zellen nachgewiesen werden. Trotz der mit dem Zellalter zunehmenden Wandstärke war keine Veränderung der elastischen Zelleigenschaften zu erkennen [80]. Insgesamt ist die Datenlage jedoch noch sehr lückenhaft; weitere Untersuchungen zur Verifizierung der Daten sind daher erforderlich. Die in der Vergangenheit durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen beschränkten sich häufig auf die reine Abbildung von Zellen und deren Oberflächenbeschaffenheit [36, 38-40, 44, 45, 51, 54, 83]. Auch der Einfluss des umgebenden Mediums ist noch nicht eindeutig geklärt. In der Literatur wird der Einfluss des osmotischen Druck des Mediums auf die elastischen Eigenschaften der Zellen kontrovers diskutiert [34, 48].

3 ENTKEIMUNGSVERFAHREN

3.1 EINLEITUNG

Bei der Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen müssen geeignete Maßnahmen zur Gewährleistung der mikrobiologischen Qualität getroffen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Applikationswege ergeben sich unterschiedliche Qualitätsanforderungen. Das Europäische Arzneibuch definiert aus diesem Grund vier Kategorien.

Zubereitungen der Kategorie 1 müssen hinsichtlich ihrer mikrobiologischen Qualität den höchsten Anforderungen entsprechen; für diese ist Sterilität gefordert. Hauptsächlich handelt es sich dabei um Zubereitungen zur parenteralen Applikation oder zur Anwendung am Auge.

Kategorie 2 umfasst Zubereitungen zur topischen Anwendung und zur Anwendung im Respirationstrakt, sofern diese nicht steril sein müssen. Die Gesamtzahl der enthaltenen aeroben Keime darf dabei eine Zahl von 10^2 Mikroorganismen pro Gramm Zubereitung nicht überschreiten. Für einige pathogene Bakterien, wie *P. aeruginosa*, gelten gesonderte Grenzen. Besonders bei flüssigen oder halbfesten Zubereitungen mit einem hohen Wasseranteil sind diese Forderungen jedoch nur durch einen geeigneten Konservierungsmittelzusatz einzuhalten.

Zubereitungen zur oralen oder rektalen Anwendung müssen den Anforderungen der Kategorie 3 entsprechen. Innerhalb dieser Kategorie werden nochmals Unterscheidungen getroffen. Die Kategorie 3A umfasst dabei hauptsächlich Zubereitungen aus synthetischen Wirk- und Hilfsstoffen. Die Gesamtzahl an koloniebildenden, aeroben Einheiten darf eine Konzentration von 10^3 Bakterien bzw. 10^2 Pilzen je Gramm Zubereitung nicht überschreiten. Keime von *E. coli* dürfen nicht vorhanden sein. In der Kategorie 3B sind Zubereitungen aus natürlichen Ausgangsstoffen tierischer, pflanzlicher oder mineralischer Herkunft zusammengefasst, bei denen eine antimikrobielle Vorbehandlung nicht möglich ist. Die Gesamtkeimzahl darf eine Konzentration von 10^4 aeroben Bakterien bzw. 10^2 Pilzen je Gramm nicht überschreiten. Darüber hinaus dürfen keine Keime von *E. coli*, *S. aureus* und keine Salmonellen nachweisbar sein.

Für pflanzliche Arzneimittel, die ausschließlich aus einer oder mehreren pflanzlichen Drogen bestehen, gelten die in Kategorie 4 festgelegten Grenzwerte. Dabei wird zwischen Zubereitungen unterschieden, denen vor dem bestimmungsgemäßen Gebrauch siedendes Wasser zugesetzt wird (4A) und solchen, bei denen dies nicht vorgesehen ist (4B). Da davon auszugehen ist, dass siedendes Wasser die vorhandene Keimzahl deutlich verringert,

gelten für die Kategorie 4A weiter gefasste Grenzen als für die Kategorie 4B. So ist bei Zubereitungen der Kategorie 4A eine Gesamtkeimzahl von 10^7 aeroben Bakterien und 10^5 Pilzen je Gramm zulässig, wohingegen Zubereitungen der Gruppe 4B nur maximal 10^5 aerobe Bakterien und 10^4 Pilze je Gramm enthalten dürfen. Zudem ist für die Kategorie 4B eine maximale Konzentration von 10^3 Enterobakterien je Gramm vorgeschrieben. Keime von *E. coli* und Salmonellen dürfen nicht enthalten sein.

Aus diesen Forderungen ergibt sich die Konsequenz, dass die mikrobiologische Qualität pharmazeutischer Zubereitungen und deren Ausgangsstoffe immer zu kontrollieren ist und gegebenenfalls keimreduzierende Maßnahmen ergriffen werden müssen. Dabei ist die Wahl des richtigen Entkeimungsverfahrens sowohl für die Effektivität der Methode als auch für die Stabilität der pharmazeutischen Zubereitung von besonderer Bedeutung. Im Folgenden werden zunächst die Sterilisationsverfahren des Europäischen Arzneibuches vorgestellt und deren Vor- und Nachteile bewertet. Der zweite Teil enthält eine Übersicht verschiedener alternativer nicht-thermischer Entkeimungsverfahren.

3.2 METHODEN DES EUROPÄISCHEN ARZNEIBUCHES ZUR ENTKEIMUNG PHARMAZEUTISCHER ZUBEREITUNGEN

3.2.1 DAMPFSTERILISATION

Die Dampfsterilisation mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf bei 121°C, 2 bar und einer Mindesteinwirkzeit von 15 min ist als Standard- und Referenzverfahren das am häufigsten eingesetzte Sterilisationsverfahren. Verfahren mit abweichendem Temperatur-Zeit-Profil sind erlaubt; es bedarf allerdings des Nachweises, dass diese den Anforderungen des vorgegebenen Verfahrens (121°C, 2 bar, 15 min) entsprechen. Das seit einigen Jahrzehnten etablierte F_0 -Konzept ermöglicht, ausgehend von einer exponentiellen Inaktivierungskinetik, die Berechnung der Letalität des Verfahrens bei abweichender Temperatur im Vergleich zum Standardverfahren bei 121°C [84, 85]. Die zur Berechnung notwendigen Parameter ergeben sich aus der Resistenz der widerstandsfähigsten Organismen gegenüber dem Sterilisationsprinzip. Das Europäische Arzneibuch sieht für die Validierung von Dampfsterilisationsprozessen den Einsatz der besonders resistenten *G. stearothermophilus* Sporen als Bioindikatoren vor. Die verfahrensrelevante Charakterisierung der Sporen erfolgt über den D-Wert und den z-Wert, wobei der D-Wert die dezimale Reduktionszeit bei einer betrachteten Temperatur darstellt und der z-Wert ein Maß für die Temperaturabhängigkeit des D-Wertes ist. Dieser gibt an, welche Temperaturänderung notwendig ist, den D-Wert um den Faktor 10 zu verändern.

Inwiefern die Beschreibung des Inaktivierungsprozesses mit einer exponentiellen Funktion den tatsächlichen Abläufen entspricht, ist indes noch nicht vollständig geklärt. Einige Autoren sind der Auffassung, dass die Inaktivierung mit einem sigmoiden Kurvenverlauf zu beschreiben ist [86]. Als Begründung wird ein unterschiedlich starkes Ansprechverhalten der Keime auf die Sterilisationsbedingungen angeführt.

Die Anforderungen des Europäischen Arzneibuches an die Effektivität der Sterilisation im Endbehältnis mit gespanntem und gesättigtem Wasserdampf sind über den SAL-Wert genau definiert. Dieser leitet sich direkt aus der Inaktivierungskinetik des Verfahrens ab. Der geforderte SAL-Wert von 10^{-6} gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, in einer Menge von 10^6 sterilisierten Einheiten einen lebensfähigen Mikroorganismus zu finden. Unter Berücksichtigung dieser Forderung sind zwei Verfahrensweisen möglich, das Overkill-Verfahren und das Bioburden-orientierte Verfahren. Die Prozessparameter beim Overkill-Verfahren sind dabei so gewählt, dass selbst hochresistente Mikroorganismen mit einer höheren Effizienz abgetötet werden als es für das Erreichen des geforderten SAL-Wertes

notwendig wäre. Die theoretisch mögliche Keimzahlreduktion muss dabei ≥ 12 Log-Stufen betragen. Dem ausschließlich auf die Sterilisationssicherheit abgestellten Overkill-Verfahren steht das produktschonendere Bioburden-orientierte Verfahren gegenüber. Dabei wird vor der Sterilisation die mikrobiologische Belastung der Sterilisationsgüter (Bioburden) bestimmt. Die genaue Kenntnis der Ausgangskeimzahl N_0 , sowie des D- und z-Wertes der widerstandsfähigsten Mikroorganismenart erlaubt nach Festlegung der Sterilisationstemperatur die Berechnung der Mindesteinwirkzeit. Somit kann eine unnötige thermische Belastung des Sterilisationsgutes durch redundanten Wärmeeintrag vermieden werden. Eine weitere Verkürzung der Einwirkzeit bei gleichzeitiger Anhebung der Sterilisationstemperatur kann ebenfalls zu einer Verringerung der Abbaurate thermolabiler Inhaltsstoffe führen [87]. Auch ein fraktioniertes, diskontinuierliches Temperaturprogramm, wie es bei der Tyndallisation Anwendung findet, kann aufgrund der vergleichsweise niedrigen Prozesstemperaturen zum Schutz thermolabiler Sterilisationsgüter beitragen [88].

Ein großer Vorteil der Dampfsterilisation besteht in der Möglichkeit einer Sterilisation im Endbehältnis; die Gefahr einer Rekontamination kann dadurch weitestgehend ausgeschlossen werden. Risiken bei der Dampfsterilisation, die mit einer Verminderung der Abtötungsgeschwindigkeit einhergehen, können Luftinseln, nicht kondensierbare Gase im Dampf oder Überhitzungen durch hygroskopische Kondensation sein. Die Sterilisation vieler wasserfreier Güter sowie Güter, die sich durch Wasserkontakt irreversibel verändern, ist mittels Dampfsterilisation nicht möglich. Bei porösem Sterilisationsgut, wie Verbandmaterial, ist ein Vorvakuum notwendig, um Luftinseln, und damit Bereiche schlechter Wärmeübertragung, zu vermeiden. Bei der Sterilisation wässriger Zubereitungen ist zu berücksichtigen, dass die Behältnisse möglichst voll befüllt sind, um einen Überdruck im Gefäß gegenüber dem Systemdruck während der Sterilisation zu vermeiden. Bei der Abkühlung des Systems kann es darüber hinaus zu einem vergleichsweise langsamen Druckabfall in den Behältnissen kommen, da das meist als Verpackungsmaterial verwendete Glas eine schlechte Wärmeleitfähigkeit aufweist und sich dadurch ein Temperatur- und Druckgradient aufbauen kann. Die Gefahr eines Zerplatzens der Gefäße kann durch einen äußeren Stützdruck während der Abkühlungsphase beseitigt werden.

3.2.2 STERILISATION DURCH TROCKENE HITZE

Die Standardbedingungen dieser Methode sind 160°C für 2 h. Der für die Sterilisation geforderte SAL-Wert liegt wie bei der Dampfsterilisation bei 10^{-6} . Von den Standardbedingungen abweichende Temperatur-Zeit-Profile sind ebenfalls gestattet, sofern der

geforderte SAL-Wert gewährleistet ist. Als Bioindikator für die Prozessvalidierung werden Sporen von *B. atrophaeus* empfohlen. Trockene Hitze bei Temperaturen über 220°C wird häufig zur Sterilisation und Entpyrogenisierung von Glasmaterial verwendet. In diesen Fällen ist eine Validierung des Verfahrens mit *B. atrophaeus* Sporen wenig sinnvoll, stattdessen wird der Einsatz standardisierter Endotoxin-Zubereitungen empfohlen.

Das Anwendungsgebiet der Sterilisation mit trockener Hitze beschränkt sich hauptsächlich auf Geräte und Verpackungsmaterialien aus Glas, Porzellan oder Metall und auf hitzebeständige Pulver sowie wasserfreie Fette, Wachse und Öle. Für die Effektivität des Verfahrens ist der Restwassergehalt des Sterilisationsgutes von entscheidender Bedeutung; je höher der Feuchtigkeitsgehalt der zu inaktivierenden Sporen, und damit verbunden die resultierende Verdunstungskälte, desto widerstandsfähiger sind diese. Da die trockene Heißluft keine eindeutige Zustandsbeschreibung darstellt, sondern auf Wasseraktivitäten (a_w -Wert) von 0-0,15 im Sterilisationsgut angewendet wird, sind große Streuungen der Resistenzdaten zu beobachten. Daraus ergibt sich, dass der Verlauf der Inaktivierung keine reine Temperatur-Zeit-Beziehung wiedergibt, sondern zusätzlich vom Wassergehalt beeinflusst wird.

Die vergleichsweise geringe Effektivität der trockenen Hitze gegenüber der Dampfsterilisation liegt in der wesentlich schlechteren Wärmeleitfähigkeit der Luft begründet. Um diesen Nachteil zu kompensieren, muss neben deutlich höheren Prozesstemperaturen bei längeren Einwirkzeiten auch ein ständiger Heißluftstrom sichergestellt werden. Trotz dieser Maßnahmen ist bei einer Sterilisation im Endbehältnis mit sehr langen Ausgleichzeiten zu rechnen.

3.2.3 STRAHLENSTERILISATION

Die Sterilisation von Materialien mit dieser Methode wird durch eine Bestrahlung mit β - oder γ -Strahlung erreicht. Als γ -Strahler kommen dabei ^{60}Co oder ^{137}Cs zum Einsatz. γ -Strahlen haben im Vergleich zu β -Strahlen bei gleicher Energie ein 60-fach größeres Durchdringungsvermögen. Die Standardabsorptionsdosis beträgt 25 kGy, wobei davon abweichende Dosen ebenfalls erlaubt sind, sofern die Forderung nach einem SAL-Wert von 10^{-6} oder kleiner erreicht wird. Insoweit ist zu beachten, dass bereits bei einer Dosis von 1 kGy nahezu alle vegetativen Bakterien (99,970-99,999%) abgetötet werden, jedoch die 5-fach höhere Dosis notwendig ist, um eine 100 %ige Abtötung zu erreichen [2]. Anders als bei den bisher vorgestellten Sterilisationsverfahren wird der D-Wert bei der Strahlensterilisation nicht als Zeit, sondern als Dosis angegeben. Zu berücksichtigende Einfluss-

faktoren auf die Strahlensterilisation sind: die Vegetationsphase der abzutötenden Mikroorganismen (teilungsaktive Zellen sind empfindlicher als in der Ruhephase befindliche), der Sauerstoffgehalt des Sterilisationsgutes (eine höhere Sauerstoffkonzentration führt zu einer stärkeren Ozon-Bildung), der Feuchtigkeitsgehalt (Wasser wird zu Wasserstoffperoxid oxidiert und verstärkt dadurch die Wirkung) sowie die Temperatur. Zur Überprüfung der Effektivität des Sterilisationsverfahrens werden Sporen von *B. pumilus* als Bioindikator empfohlen.

Der Haupteinsatzbereich ionisierender Strahlen zur Sterilisation liegt bei medizinischen Geräten, Einmalartikeln und Primärpackmitteln. Dem Einsatz zur Sterilisation von Arzneistoffzubereitungen kommt nur eine untergeordnete Bedeutung zu. Dennoch ist dieser mit Vorteilen verbunden. Wie bei der Dampfsterilisation und der Sterilisation mit trockener Hitze ist auch hier eine Sterilisation im Endbehältnis möglich und unter Verwendung eines vollständig validierten Verfahrens auch eine parametrische Freigabe, so dass eine zusätzliche Prüfung auf Sterilität entfallen kann. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Verfahren zur Sterilisation wässriger Zubereitungen aufgrund der prozessbedingten Wasserstoffperoxid-Bildung ungeeignet ist. Auch andere Hilfsstoffe, wie das bioabbaubare Copolymer Poly(lactid-co-glycolid) zur Mikroverkapselung, können die Sensitivität des Wirkstoffes gegenüber der eingesetzten Strahlung verstärken [89]. Wirkstoffgruppen, bei denen eine Strahlensterilisation Anwendung findet sind Antibiotika, Kortikoide und Proteine. Zum Teil wird hier auch auf eine Strahlenpasteurisierung im Dosisbereich von ≤ 10 kGy zurückgegriffen.

Im Vergleich zu β - oder γ -Strahlen haben UV-Strahlen eine deutlich verminderte Eindringtiefe, was einerseits eine geringere Materialbelastung realisiert, aber andererseits auch die Tiefenwirksamkeit soweit vermindert, dass ein effektiver Einsatz nur an glatten Oberflächen oder zur Trinkwasserdesinfektion bzw. zur Entkeimung der Raumluft möglich ist. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen ist eine ausreichende Effektivität des Verfahrens vorhanden. Mit UV-Licht emittierenden Gasplasmen wurden an Bakteriensporen Reduktionsraten von 6-7 Log-Stufen nachgewiesen [90].

3.2.4 GASSTERILISATION

Die Gassterilisation besitzt für Arzneimittel inzwischen kaum noch Bedeutung. Häufigstes Anwendungsgebiet ist die Sterilisation von medizinischen Geräten, Reinräumen und in zunehmendem Maße von Isolatoren [91]. Insbesondere Ethylenoxid, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid stehen dafür als Substanzen zur Verfügung [92]. Aufgrund der

fehlenden Relevanz für pharmazeutische Zubereitungen wird an dieser Stelle auf weitere Einzelheiten verzichtet.

3.2.5 FILTRATION

Für Wirkstoffe und Zubereitungen, die einer Sterilisation im Endbehältnis nicht unterzogen werden können, besteht die Möglichkeit einer Filtration durch bakterienzurückhaltende Filter als finaler Schritt der Produktentkeimung. Die Anwendung beschränkt sich jedoch auf flüssige und gasförmige Sterilisationsgüter. Eine Sterilfiltration fester Substanzen ist nur nach deren Auflösen, Aufschmelzen bzw. bei geeigneter Partikelgröße als Dispersion möglich [93]. Die Ausstattung, Behältnisse und wenn möglich die Einsatzstoffe, sind im Vorfeld einer geeigneten Sterilisation zu unterziehen. In jedem Fall ist eine möglichst geringe Keimbelastung des Ausgangsmaterials sicherzustellen. Im Vergleich zu den bereits genannten Sterilisationsverfahren sind bei der Sterilfiltration Abstriche hinsichtlich der Prozesssicherheit zu machen. Diese Unsicherheiten resultieren einerseits aus der Prozessführung, da das Verfahren nicht am abgefüllten Produkt im Endbehältnis durchgeführt werden kann, andererseits ist eine Ableitung der Prozesssicherheit aus der Extrapolation einer Inaktivierungskinetik nicht möglich. Die Forderung eines bestimmten SAL-Wertes ist daher auch wenig sinnvoll. Umso wichtiger ist die Validierung und regelmäßige Revalidierung des Verfahrens. Dabei wird üblicherweise nicht nur die Filtration, sondern auch die anschließende aseptische Abfüllung betrachtet. Die Abfüllung von flüssigem Nährmedium unter Produktionsbedingungen (Media Fill) ist dafür die Methode der Wahl [94, 95].

Das Prinzip der Membranfiltration besteht in der physikalischen bzw. physikochemischen Abscheidung vorhandener Mikroorganismen. Das sich die Integrität der Filtermembran nicht voraussagen lässt, ist ein weiterer Risikofaktor. Um diesen so gering wie möglich zu halten, ist vor und nach jeder Filtration ein physikalischer Integritätstest durchzuführen. Die am häufigsten eingesetzten Verfahren sind dabei der Bubble-Point-Test, der Druckhaltetest sowie der Forward-Flow-Test [96]. Die jeweiligen Prüfparameter sind im Rahmen einer Prozessvalidierung zu definieren, da die Produkteigenschaften des Filtrationsgutes (Benetzungswinkel, Viskosität) einen erheblichen Einfluss besitzen. Für den Nachweis der Eignung des Filters ist ein Bakterienrückhaltetest durchzuführen. Das Europäische Arzneibuch schlägt dafür *B. diminuta* als Testkeim vor. Um einen Einfluss des Sterilisationsgutes auf das Rückhaltevermögen des Filters möglichst früh zu erkennen, sollte der Belastungstest nach Möglichkeit mit der Produktlösung erfolgen, die auch im Routineprozess filtriert werden soll. Grundsätzlich sind bei den zur Verfügung stehenden

Filtertypen Oberflächenfilter und Tiefenfilter zu unterscheiden. Die wichtigsten Abscheidemechanismen sind der Partikelausschluss durch die definierte Porengröße (Siebeffekt) sowie die Trägheits- und Adsorptionsabscheidung [97]. Daraus ergeben sich wesentliche Vorteile gegenüber der Sterilisation im Endbehältnis. Einerseits vermindert die physikalische Abscheidung die Gefahr einer Endotoxin-Freisetzung aus eventuell vorhandenen gramnegativen Bakterien, andererseits können durch geeignete Filtermaterialien (Ultrafilter) bereits im Filtrationsgut enthaltene Endotoxine entfernt werden. Die Auswahl der zur Verfügung stehenden Filtermaterialien (z.B. Cellulosederivate, gesintertes Glas oder Keramik, Polycarbonate) muss unter Berücksichtigung der Produktkompatibilität erfolgen, wobei besonders auf eventuelle Produktverluste durch Adsorptionsvorgänge und Produktverunreinigungen durch das Herauslösen von Filterbestandteilen zu achten ist.

3.3 ALTERNATIVE ENTKEIMUNGSVERFAHREN

3.3.1 HOCHDRUCKENTKEIMUNG

Erste Studien zur Inaktivierung von Mikroorganismen mit hydrostatischem Druck gehen bis in das frühe 20. Jahrhundert zurück [98]. Es konnte bereits damals eine Lebendzellzahlreduktion unter Einwirkung von Drücken zwischen 2.000 und 3.000 bar um mehrere Zehnerpotenzen gezeigt werden. In den darauf folgenden Jahrzehnten rückte neben der Inaktivierung von vegetativen Mikroorganismen die Abtötung von Sporen immer stärker in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Dabei zeigte sich, dass die Inaktivierung der Sporen, im Gegensatz zu vegetativen Mikroorganismen, nicht einer Kinetik 1. Ordnung folgt. Ursache hierfür sind zwei überlagerte Prozesse, die Sporenaktivierung und erst im Anschluss die Inaktivierung der ausgekeimten Formen. Auch steht die Inaktivierung der Sporen in keinem proportionalen Verhältnis zum angewandten Druck, wie es bei vegetativen Mikroorganismen der Fall ist. Vielmehr konnte an *B. atrophaeus*-Sporen ein Druckoptimum bei ca. 2.000 bar beobachtet werden [99]. Niedrigere Drücke führen zwar zu einem Auskeimen der Sporen, sind jedoch für deren Inaktivierung zu gering. Demgegenüber verhindern sehr hohe Drücke das Auskeimen der Sporen und somit eine effektive Inaktivierung. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde eine 2-stufige Methode entwickelt, bei der zunächst eine Sporenaktivierung bei 600-1.500 bar erfolgt und im Anschluss die Inaktivierung bei wesentlich höheren Drücken (3.000-5.000 bar) [100]. Auch ein mehrmals wiederholter rascher Druckwechsel führt zu dem gewünschten Ergebnis. So konnten Sojka et al. Suspensionen von *B. atrophaeus* Sporen (10^8 Sporen/ml)

durch rasche Druckwechsel zwischen 600 und 5.000 bar (Haltezeit: je 1 min) bei einer Prozesstemperatur von 70°C innerhalb von 25 min vollständig inaktivieren [101]. Neben dem angewandten Druck hat die Temperatur bei der Inaktivierung von Sporen einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Inaktivierung, wobei sich je nach Art der Sporen sowohl niedrige Temperaturen (4°C) als auch hohe Temperaturen (40-70°C) als besonders effektiv erwiesen haben und zu einer vollständigen Inaktivierung führten [100, 102]. Neben der Inaktivierung prokaryotischer Zellen wurde auch die Anwendbarkeit des Verfahrens auf Hefen und Schimmelpilze untersucht. Versuche an *C. albicans* und *A. oryzae* bei 2.000-3.000 bar bestätigten auch hier den keimtötenden Einfluss von hohem Druck. Nach einer Druckhaltezeit von 4 h bei 40°C waren alle Zellen abgetötet [103].

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an hochdruckbehandelten Mikroorganismen zeigten, dass diese nicht zerstört werden. In einigen Fällen konnte lediglich eine Schädigung der äußeren Zellwandbereiche bzw. eine veränderte Lichtdurchlässigkeit des Cytoplasmas beobachtet werden [103, 104]. Eine Störung der zellulären Strukturen und Reaktionssysteme wird daher als Ursache für das Absterben der Zellen vermutet [99]. Darüber hinaus wurde eine Veränderung des Genotyps bzw. eine Selektion besonders widerstandsfähiger Sporen zunächst ausgeschlossen. Sporen, die eine Druckbehandlung überlebten, konnten die dafür verantwortlichen Eigenschaften nicht auf die nächste Generation übertragen. Die Sporen der Folgegeneration wiesen dasselbe Absterbeverhalten auf [105]. Neuere Untersuchungen an Sporen von *E. coli* und *B. thuringiensis* zeigten jedoch, dass der Einfluss hoher Drücke durchaus zu einer Veränderung des Bakteriengenoms führen kann. Die Mutationen führten in den beobachteten Fällen zu einer höheren Druckresistenz. Zudem kam es zu deutlichen Veränderungen des Phänotyps, erkennbar an Form und Größe der nach Anzucht auf Nähr-Agar erhaltenen Kolonien [106]. Praktische Anwendung findet die Hochdruckentkeimung inzwischen in der Lebensmittelindustrie; insbesondere Milch und Milchprodukte [107, 108] sowie Frucht- und Gemüsesäfte [109] werden damit behandelt. Auch für die Entkeimung von Fleisch konnte die Anwendbarkeit des Hochdruckverfahrens nachgewiesen werden [110]. Dem Vorteil des Verfahrens, ein weitgehender Erhalt der natürlichen Inhaltsstoffe, stehen diverse Nachteile gegenüber. Um eine effektive Druckübertragung zu realisieren, ist das Verfahren immer an ein flüssiges Medium gebunden. Die Entkeimung von Feststoffen ist zwar in suspensierter Form möglich, erfordert jedoch einen zusätzlichen Aufbereitungsschritt nach der

Entkeimung, was zu einer zusätzlichen Belastung des Produktes führt. Zudem ist aufgrund des Arbeitsbereiches von ca. 3.000-7.000 bar mit hohen Anlagenkosten zu rechnen.

3.3.2 ENTKEIMUNG MIT ÜBERKRITISCHEM CO₂

Überkritisches CO₂ ist seit längerem Bestandteil der pharmazeutischen Forschung. Die extrahierende Wirkung ist seit den 1930er Jahren bekannt und findet seit über 25 Jahren in der Naturstoffextraktion, z.B. von vegetabilen Ölen, Anwendung [111]. Daneben haben sich in jüngerer Vergangenheit weitere Anwendungsfelder erschlossen. Neben der Supercritical Fluid Chromatography als analytisches oder präparatives Verfahren zur Stofftrennung sind vor allem Anwendungen zur Partikelgrößenverkleinerung und zur Entkeimung flüssiger Zubereitungen zu nennen. Allen Anwendungen ist dabei die Nutzung der mit dem überkritischen Zustand einhergehenden Eigenschaften gemein. So wird bei der Partikelformung das feste Material im Fluid bei 100-350 bar gelöst und durch schnelle Entspannung wieder ausgefällt (RESS, rapid expansion from supercritical solutions). Das erhaltene Produkt weist einen sehr hohen Mikronisierungsgrad auf, verbunden mit einer engen Korngrößenverteilung bei gleichzeitig geringem Energieeintrag, und ist besonders für thermolabile Wirkstoffe einer mechanischen Zerkleinerung vorzuziehen [112]. Einziger Nachteil dieses Verfahrens ist der, aufgrund der begrenzten Löslichkeit, verhältnismäßig geringe Stoffumsatz. Ausbeuten von 1 g pro Tag stehen dabei einer breiten Anwendung des Verfahrens noch entgegen [113]. Eine Erhöhung der Effektivität ist jedoch, vergleichbar der Entkeimung mit verdichteten Gasen, durch eine Erhöhung des Prozessdrucks zu erzielen [114]. Alternativ besteht die Möglichkeit, das überkritische Gas als Antisolvent zur Fällung des in herkömmlichen Lösungsmitteln gelösten Stoffes einzusetzen [111].

Die Entkeimung mit überkritischem Kohlendioxid ist methodisch mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren vergleichbar. Kohlendioxid wird unter Druck oberhalb der kritischen Temperatur von 31°C im zu entkeimenden Gut gelöst und nach einer Druckhaltezeit von mehreren Minuten bis einigen Stunden wieder entspannt. Für die auftretende Zellschädigung werden in der Literatur folgende Mechanismen diskutiert:

- Absenkung des intrazellulären pH-Wertes [115, 116]
- Zerplatzen der Zellen während der Entspannung des Systems [116]
- Modifikation der Zellmembran [117]
- Extraktion von Zellwandlipiden [117]
- Enzyminaktivierung [117, 118]
- Extraktion von Zellbestandteilen [117, 118]
- Verschiebung des intrazellulären Elektrolytgleichgewichts [119]

Mit Ausnahme der Azidifizierung des Cytoplasmas und der Verschiebung des intrazellulären Elektrolytgleichgewichtes sind die genannten Schädigungsmechanismen auch für andere verdichtete Gase anzunehmen. Die deutliche pH-Wert-Absenkung, druckabhängig bis auf pH 3, ist aus Sicht der Wirkstoffstabilität als problematisch zu bewerten. Trotz der inzwischen erreichten sehr hohen Reduktionsraten (Tab. 11) ist daher die Suche nach alternativen Gasen, die eine vergleichbare oder höhere Potenz im Druckwechselverfahren aufweisen und dabei möglichst reaktionsträge sind, unbedingt erforderlich.

Tab. 11: publizierte Daten der mit Kohlendioxid erzielten Reduktionsraten

Spezies	Druck	Temperatur	Druckhaltezeit	Startkeimzahl	log N/N ₀	Referenz
<i>A. niger</i> ²	203 bar	35°C	120 min	nicht angegeben	4,9	[118]
<i>B. cereus</i>	205 bar	34°C	36 min	5,1x10 ⁷ KBE/ml	2,0 ¹	[116]
<i>B. subtilis</i>	74 bar	38°C	2,5 min	nicht angegeben	> 7 ³	[98]
<i>B. subtilis</i> ²	203 bar	35°C	120 min	nicht angegeben	0,3	[118]
<i>B. stearo-thermophilus</i> ²	203 bar	35°C	120 min	nicht angegeben	0	[118]
<i>E. coli</i>	34 bar	37°C	ca. 5 min	1,5x10 ⁸ KBE/ml	2,0	[120]
<i>P. aeruginosa</i>	205 bar	34°C	36 min	7,4x10 ⁸ KBE/ml	6,0 ¹	[116]
<i>P. aeruginosa</i>	74 bar	38°C	2,5 min	nicht angegeben	> 7 ³	[98]
<i>S. aureus</i>	205 bar	34°C	36 min	2,5x10 ⁹ KBE/ml	3,0 ¹	[116]
<i>S. aureus</i>	203 bar	35°C	120 min	nicht angegeben	4,8	[118]
<i>S. cerevisiae</i>	40 bar	25°C	300 min	1,0x10 ⁸ KBE/ml	1,9	[121]
<i>S. cerevisiae</i>	40 bar	40°C	180 min	1,0x10 ⁸ KBE/ml	8,0	[121]

¹ nach 3 Druckwechselzyklen

² Dauerformen

³ keine lebensfähigen Keime nachweisbar

3.3.3 ULTRASCHALLENTKEIMUNG

Mechanische Schwingungen in Gasen, Flüssigkeiten oder Feststoffen mit Frequenzen oberhalb von 20 kHz werden als Ultraschall bezeichnet. Die elektrische Ultraschallerzeugung erfolgt in der Regel über piezoelektrische Schallgeber durch eine elastische Verformung ferroelektrischer Stoffe (z.B. Bleizirkonattitanat) im hochfrequenten elektrischen Feld. Durch eine Sonotrode wird die Schallenergie auf das Medium übertragen. In Flüssigkeiten breiten sich diese Schallwellen meist in Form von Longitudinalwellen (Kompressionswellen) aus. Die keimabtötende Wirkung hochfrequenter Ultraschallwellen wird auf die im wässrigen Medium auftretende akustische

Kavitation und ihre unmittelbaren Folgeerscheinungen wie Scherung, Druck, lokale Erhitzung und Radikalbildung zurückgeführt [122, 123]. Zwei Arten der Kavitation sind dabei zu unterscheiden, die harte und die weiche Kavitation. Bei der harten Kavitation enthalten die durch die Schallwellen erzeugten Hohlräume Dampf der angrenzenden Flüssigkeit, dagegen sind die bei der weichen Kavitation entstehenden Hohlräume mit dem in der Flüssigkeit gelösten Gas gefüllt. Sofort nach ihrem Entstehen implodieren diese Hohlräume wieder, wobei im Nahbereich der Implosion Drücke von 10.000 bar auftreten können [124]. Parallel dazu wurden an der Oberfläche der Kavitationsblasen Temperaturen von bis zu 4.800°C bestimmt [125]. Trotz der geringen Fernwirkung werden die Mikroorganismenzellen diesen extremen Belastungen direkt ausgesetzt, da die Kavitationsblasen bevorzugt an Grenzflächen entstehen. Zur effektiven Abtötung von Mikroorganismen ist es daher wichtig, im Bereich der maximalen Kavitation zu arbeiten. Diese ist direkt von der verwendeten Frequenz und der Intensität des Ultraschalls abhängig. Dabei gilt: je niedriger die Frequenz, desto geringer die Kavitationsschwelle. Entkeimungsversuche von Drakopoulou et al. im niederfrequenten Bereich von 24 kHz ergaben bei einer Behandlungsdauer von 60 min eine Keimzahlreduktion um bis zu 2,5 Zehnerpotenzen [126]. Bei entsprechender Ultraschallintensität sind jedoch auch höhere Frequenzen anwendbar. So konnte Süß bei einer Frequenz von 800 kHz innerhalb von 240 min die Anzahl keimfähiger Sporen einer *B. atrophaeus* Sporensuspension um ca. 90 % verringern [127]. In eigenen Vorversuchen bei 20 kHz war in Abhängigkeit von der Ultraschallintensität nach einer Behandlungsdauer von 60 min die Anzahl lebensfähiger *B. pumilus* Zellen um 50-90 % reduziert. Xin et al. gelang durch eine kombinierte Prozessführung mit Ultraschall und Hochspannungsimpulsen eine deutliche Steigerung der Reduktionsraten, wobei synergistische Effekte die Effektivität in einem höheren Maß beeinflussten als es die Ergebnisse der Einzelversuche vermuten ließen [123]. Die Kombination des Ultraschallverfahrens mit der Dampfsterilisation führte ebenfalls zu einem effizienteren Prozess. So konnte die Prozesszeit um bis zu 85 % verringert werden [128].

Bei der praktischen Anwendung des Verfahrens ist zu berücksichtigen, dass es durch den hohen Energieeintrag zu einer starken Erwärmung des Systems kommt und daher bei Anwesenheit thermolabiler Inhaltsstoffe eine aktive Kühlung zwingend notwendig ist. Daneben ist die mögliche Radikalbildung kritisch zu betrachten. Die im wässrigen Milieu entstehenden Wasserstoff- und Hydroxyl-Radikale sind sehr reaktiv und können über das gebildete Wasserstoffperoxid unerwünschte Oxidationsreaktionen verursachen [129].

3.3.4 GEPULSTE ELEKTRISCHE FELDER

Beim Elektroimpulsverfahren werden Mikroorganismen mit Hilfe von Hochspannungsimpulsen inaktiviert bzw. abgetötet. Das Inaktivierungsprinzip ist noch nicht vollständig geklärt, beruht aber vermutlich auf einer durch gepulste elektrische Felder induzierten Porenbildung in den Membranen biologischer Zellen. Es wird angenommen, dass bei einem Membranpotential > 1 V die resultierenden Anziehungskräfte zwischen der gegensinnig geladen inneren und äußeren Membranoberfläche eine starke Kompression der Zellmembran verursachen in deren Folge es zu der beschriebenen Porenbildung kommt [130]. Je nach Feldstärke und Anzahl der Hochspannungsimpulse kann diese Schädigung reversibel oder irreversibel sein. Dieses Prinzip der Elektroporation ist seit längerem bekannt und wird in der Medizin zum Einschleusen von Genmaterial oder Wirkstoffmolekülen in Zellen sowie in der Krebstherapie genutzt. Für eine Anwendung als Entkeimungsverfahren ist eine irreversible Schädigung der Mikroorganismenzellen erforderlich. Je nach Art der Mikroorganismen sind dafür unterschiedliche Feldstärken notwendig. Grahl et al. konnten für *S. cerevisiae* Kulturen eine kritische Feldstärke von 4,6 kV/cm bestimmen, für *E. coli* lag diese im Bereich von 13,0 kV/cm [130]. Bei einer Feldstärke von 6,8 kV/cm war nach 5 Hochspannungsimpulsen die Zahl der lebenden *S. cerevisiae* Zellen um 5 Zehnerpotenzen reduziert. Eine ähnlich hohe Reduktionsrate konnte bei Zellen von *E. coli* erst mit 22 kV/cm und 20 Impulsen erzielt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass mit steigender Anzahl der applizierten Hochspannungsimpulse auch die Temperatur des zu behandelnden Gutes steigt. Zur Verringerung der thermischen Belastung kann daher eine zusätzliche Kühlung des Systems notwendig sein [109]. Parallel auftretende elektrochemische Reaktionen im Gut (z.B. Elektrolyse von Wasser) wirken sich ebenfalls nachteilig auf die Anwendbarkeit des Verfahrens aus [131]. Auch ist eine effektive Abtötung eventuell vorhandener Sporen nicht möglich. Eine Kombination mit anderen Entkeimungsverfahren scheint daher sinnvoll. So konnte Spilimbergo et al. durch eine Vorbehandlung des zu entkeimenden Gutes mit Hochspannungsimpulsen und einer anschließenden Hochdruckbehandlung mit überkritischem Kohlendioxid einen synergistischen Effekt der beiden Verfahren erzielen [132]. Die Vorschädigung der Zellen durch die Elektroporation erhöhte die Effizienz des überkritischen Kohlendioxids dabei deutlich. Insgesamt sind die Anwendungsmöglichkeiten für dieses Verfahren begrenzt, da zur Erzeugung hoher elektrischer Feldstärken geringe Elektrodenabstände notwendig sind.

3.3.5 ULTRAKURZE LICHTBLITZE

Analog dem Elektropulsverfahren wird beim Lichtimpulsverfahren gepulste Energie sehr hoher Intensität auf das zu entkeimende Gut übertragen. Xenon-Blitzlampen emittieren ultrakurze Lichtblitze, welche in ihrem Spektrum dem Sonnenlicht ähneln, jedoch 20.000-fach intensiver sind und mit 25-40 % einen deutlich erhöhten UV-Anteil aufweisen. Im Vergleich zum herkömmlichen, mit Niederdruck-Quecksilberlampen erzeugten UV-Licht, ist das Lichtimpulsverfahren deutlich effektiver. Zurückzuführen ist dies auf den hohen Anteil an UV-C Strahlung. Licht in diesem Wellenlängenbereich (200-280 nm) wird von den Nukleinsäuren der Bakterien-DNA besonders stark absorbiert und führt zu deren Schädigung [133]. Untersuchungen an verschiedenen vegetativen Mikroorganismen ergaben Reduktionsraten von bis zu 7 Zehnerpotenzen [133]. Von einer effektiven Sporen- und Viren-Abtötung wurde ebenfalls berichtet [133, 134].

Aufgrund der geringen Eindringtiefe der Lichtimpulse in das Produkt ist eine Tiefenwirkung jedoch nicht möglich. Somit ist eine sichere Anwendung des Verfahrens auf die Entkeimung von Oberflächen bzw. dünnen, lichtdurchlässigen Medien beschränkt. Im Hinblick auf die geringe Einwirkdauer von 200-300 μs je Lichtblitz, wobei ein Entladungsblitz zur Abtötung der Mikroorganismen genügt, sind jedoch hohe Durchsatzraten zu realisieren.

4 ENTKEIMUNGSVERSUCHE MIT DEM DRUCKWECHSELVERFAHREN

4.1 EINLEITUNG

Der Bedarf an alternativen, sicheren und kostengünstigen Verfahren für die Entkeimung thermolabiler flüssiger Arzneistoffzubereitungen führte neben den in Kap. 3.3 beschriebenen Verfahren unter anderem auch zur Entwicklung des Druckwechselverfahrens (DWV), welches eine schonende Entkeimung bei gleichzeitigem Erhalt der Wirkstoffe ermöglichen soll. Dabei wird Gas unter Druck im flüssigen Sterilisationsgut gelöst. Nach einer Ausgleichzeit (Druckhaltezeit) wird das gesamte System einer schnellen Entspannung unterworfen. Die gelöste Gasmenge ist vom beaufschlagten Druck abhängig; daher kommt es bei einem Druckabfall zu einer Freisetzung von gelöstem Gas. Je größer dabei das Druckgefälle, desto stärker das Ausgasen der Lösung. Das während des Gaseintrags und der sich anschließenden Druckhaltezeit in die Mikroorganismen hinein diffundierte Gas folgt auch dieser Gesetzmäßigkeit und verursacht durch das Ausgasen innerhalb der Zellen und der damit verbundenen schnellen Druck- und Volumenzunahme deren Zerplatzen. Erstmals beschrieben wurde dieser Mechanismus 1951 von D. Fraser [120]. Auf der Suche nach einem effektiven Zellaufschlussverfahren beobachtete er, dass unter Druck in einer Bakteriensuspension gelöstes Gas bei der Entspannung zu einer Zerstörung der Zellen führt. Diese ersten Versuche umfassten bereits mehrere Prozessgase; so wurde neben Kohlendioxid und Argon auch Stickstoff und Distickstoffoxid untersucht (Tab. 12).

Tab. 12: Publierte Daten der mit Stickstoff bzw. Distickstoffoxid erzielten Keimreduktionsraten

Spezies	Gas	Druck	Temperatur	Druckhaltezeit	N_0	$\log N/N_0$	Literatur
<i>E. coli</i>	N ₂	62 bar	37°C	ca. 5 min	1,5x10 ⁸ KBE/ml	0,55	[120]
<i>E. coli</i>	N ₂ O	34 bar	37°C	ca. 5 min	9,2x10 ⁷ KBE/ml	0,62	[120]
<i>S. cerevisiae</i>	N ₂	40 bar	40°C	240 min	1,0x10 ⁸ KBE/ml	0,03	[135]
<i>S. cerevisiae</i>	N ₂	40 bar	40°C	240 min	1,0x10 ⁸ KBE/ml	0,04	[121]
<i>S. cerevisiae</i>	N ₂ O	40 bar	40°C	240 min	1,0x10 ⁸ KBE/ml	4,68	[135]

N_0 : Startkeimzahl; N: Keimzahl nach der Entspannung

Aufgrund der sehr niedrigen Prozessdrücke fielen die Inaktivierungsraten jedoch entsprechend gering aus. Die Datenlage zum Inaktivierungsverhalten von Stickstoff und

Distickstoffoxid ist insgesamt sehr lückenhaft und bezieht sich ausschließlich auf Drücke < 100 bar. Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war es, Einflussgrößen auf das Druckwechselverfahren mit dem Ziel der vollständigen Entkeimung (Sterilität) bei gleichzeitigem Erhalt der Inhaltsstoffe wässriger Wirkstofflösungen zu ermitteln. Zum einen sollte die Stabilität von ausgewählten oxidations-, hydrolyse- bzw. druckempfindlichen Wirkstoffen in wässrigen Zubereitungen bewertet (vgl. Kap. 5), zum anderen mit Hilfe verschiedener Surrogatorganismen der Einfluss der Prozessparameter (z.B. Gasart, Druck, Gelöstgasmenge, Gasgemische, Temperatur, Sterilisationsmedien) auf die Effektivität des Druckwechselverfahrens bestimmt werden. Die Beeinflussung des Reduktionserfolges durch die Mikroorganismen selbst (Mikroorganismenart, Druckadaptation, Startkeimzahl) wurde ebenfalls geprüft. Es erfolgten Untersuchungen in Modell- und Realmedien. Des Weiteren wurden Sporen als besonders widerstandsfähige Kontaminanten von Arzneistoffzubereitungen in die Untersuchungen einbezogen.

4.1.1 GASLÖSLICHKEIT

Das Lösungsvermögen eines Stoffes in einem Lösungsmedium hängt von der Löslichkeit, der vorhandenen Stoffkonzentration und der Temperatur ab. Kommt ein Gas mit einer Flüssigkeit in Kontakt, so wird ein Teil des Gases in der Flüssigkeit gelöst und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen flüssiger und gasförmiger Phase ein. Die Gasaufnahme geht mit einer Volumenvergrößerung der flüssigen Phase einher. Zur Berechnung der Gaslöslichkeit in Wasser kann bei niedrigen Drücken die Gasphase als ideal betrachtet werden. Zudem gilt das Henry'sche Gesetz (Gl. 7), wonach die Konzentration des gelösten Gases in der Flüssigkeit seinem Partialdruck in der Gasphase proportional ist.

$$c_{fl} = k_H \cdot p_A \quad [Gl. 7]$$

c_{fl} Gaskonzentration in der flüssigen Phase [mol/l]

k_H Henry'scher Koeffizient [mol/l·bar]

p_A Partialdruck des betrachteten Gases in der Gasphase [bar]

Diese Gesetzmäßigkeit ist jedoch je nach Art des Gases nur bei geringen bis mäßigen Drücken hinreichend genau. Mit steigendem Druck zeigen alle Gase mehr oder weniger starke Abweichungen vom idealen Verhalten, da neben den im Henry'schen Gesetz nicht berücksichtigten Wechselwirkungen zwischen Gas und Lösungsmittel (Solvatation) intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Gasmolekülen hinzukommen.

Eine weitere gebräuchliche Größe zur Beschreibung der Gaslöslichkeit stellt der Ostwald-Koeffizient L dar (Gl. 9). Er ist definiert als der Quotient aus der Gaskonzentration in der flüssigen Phase und der Gasphase und lässt sich direkt aus dem Henry'schen Gesetz ableiten. Dazu wird der Partialdruck des Gases durch die Gaskonzentration ersetzt. Nach dem idealen Gasgesetz (Gl. 8) ergibt sich für die Gaskonzentration:

$$p_A \cdot V_g = n \cdot R \cdot T \quad [\text{Gl. 8a}]$$

$$p_A = \frac{n}{V_g} \cdot R \cdot T = c_g \cdot R \cdot T \quad [\text{Gl. 8b}]$$

Damit ergibt sich für das Henry'sche Gesetz:

$$c_{fl} = k_H \cdot c_g \cdot R \cdot T \quad [\text{Gl. 9a}]$$

$$\frac{c_{fl}}{c_g} = k_H \cdot R \cdot T = L \quad [\text{Gl. 9b}]$$

c_g Gaskonzentration in der Gasphase [mol/l]

L Ostwald'scher Löslichkeitskoeffizient

n Stoffmenge [mol]

R universelle Gaskonstante = 8,314472 J/mol·K

T absolute Temperatur [K]

V_g Volumen der Gasphase [l]

Zur exakten Bestimmung der druckabhängigen Gelöstgasmenge im Phasengleichgewicht wurden in der Vergangenheit zahlreiche analytische Methoden entwickelt. In der Literatur beschriebene Methoden sind häufig gravimetrische Messungen unter Druck [136-139], gaschromatographische Untersuchungen der Dampfphase [140], Differenzdruckmessungen [141-143] oder volumetrische Bestimmungen des durch geeignete Methoden aus der Flüssigkeit ausgetriebenen Gases [144, 145]. Um eine Abschätzung der Löslichkeit bei verschiedenen Temperaturen und Drücken zu ermöglichen, wurden anhand dieser experimentell ermittelten Daten verschiedene Berechnungsmodelle entwickelt [146-148]. Für die Berechnung der Gasmenge in den Mikroorganismen nach Einstellung des Lösungsgleichgewichtes wurde sowohl auf experimentelle als auch auf berechnete Literaturdaten zurückgegriffen (Kap. 4.3.1 u. 4.3.2). Für den Gaseintrag unter Druck wird durch die Gaskompression eine Volumenarbeit am System verrichtet. Die dadurch eingebrachte Energie führt, sofern sie nicht durch geeignete Kühlmaßnahmen abgeführt werden kann, zu einer Erwärmung des Systems. Von den verwendeten Hochdruck-

autoklaven war nur der Premex-Reaktor mit einer aktiven Kühlung ausgestattet. Die Versuche mit dem Parr-Reaktor erfolgten, bis auf wenige Ausnahmen, bei Raumtemperatur. Kurzzeitige Temperaturerhöhungen während des Gaseintrags bis auf 36°C waren zu beobachten. Umgekehrt kam es während der Entspannung des Systems infolge der Zunahme des Gasvolumens zu einer Abkühlung desselben. Dies ist mit einer Abnahme der kinetischen Energie der Gasteilchen während der Expansion zu erklären. Anders als bei idealen Gasen kommt es bei realen, verdichteten Gasen zu Wechselwirkungen zwischen den Gasmolekülen. Zur Überwindung dieser Kohäsionskräfte muss eine Arbeit geleistet werden. Die dafür notwendige Energie wird der kinetischen Energie der Gasteilchen entzogen und das Gas kühlt ab (Joule-Thomson-Effekt). Gleichzeitig nimmt die potentielle Energie der Gasteilchen zu [149].

4.1.2 GASDIFFUSION

Transportvorgänge an verschiedensten Biomembranen wurden in den vergangenen Jahrzehnten ausführlich untersucht. Die passive Diffusion, die erleichterte Diffusion (Carrier-vermittelt) und der aktive Transport konnten dabei als die wichtigsten Transportmechanismen identifiziert werden. Für Bakterienzellen ist die Cytoplasmamembran das einzige Biomembransystem. Sie regelt den gesamten aktiven und passiven Stoffaustausch der Zelle mit der Umgebung [16]. In Lösung befindliche Gase stellen in den meisten Fällen kleine, unpolare Moleküle dar, deren Transport durch die Biomembran von der Bakterienzelle nicht aktiv kontrolliert werden kann [150]. Der Konzentrationsgradient zwischen äußerem Medium und dem Cytoplasma ist somit der bestimmende Faktor für die Gasdiffusion und es gilt das Fick'sche Diffusionsgesetz. Zur Vereinfachung wird für alle weiteren Betrachtungen angenommen, dass die Gaslöslichkeit im wässrigen Cytoplasma der Gaslöslichkeit im umgebenden wässrigen Medium entspricht. Der aufgrund von im Cytoplasma gelösten Substanzen entstehende Fehler wird dabei vernachlässigt. Zur Beschleunigung des Diffusionsvorganges wurde während der Gasbeladung des Systems das flüssige Medium gerührt. Neben einer besseren Durchmischung der äußeren Phase konnte dadurch auch die hydrodynamische Grenzschicht um die Mikroorganismenzellen minimiert werden. Ausmaß und Geschwindigkeit der Gasdiffusion durch die Mikroorganismenhülle wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht direkt bestimmt. Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Gasdiffusion konnten dennoch indirekt anhand der Bewertung der Zeitabhängigkeit der Abtötungsraten gezogen werden. Darüber hinaus ließen bereits publizierte Daten eine sehr schnelle Diffusion in die Mikroorganismenzelle erwarten [151, 152].

4.2 MATERIALIEN UND METHODEN

4.2.1 MATERIALIEN

4.2.1.1 MIKROORGANISMENKULTUREN

<i>Bacillus atropheus</i>	DSM 675 (ATCC 9372)
<i>Bacillus pumilus</i>	DSM 492 (ATCC 27142)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	DSM 5934 (ATCC 7953)
<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i>	DSM 799 (ATCC 6538)
<i>Clostridium sporogenes</i>	DSM 1664 (ATCC 19404)
<i>Brevundimonas diminuta</i>	DSM 1635 (ATCC 19146)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1128 (ATCC 9027)
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 1988 (ATCC 16404)
<i>Candida albicans</i>	DSM 1386 (ATCC 10231)

4.2.1.2 NÄHRMEDIEN

CASO-Agar

CASO-Bouillon

Fleisch-Leber-Agar

Thioglycolat-Bouillon

4.2.2 METHODEN

4.2.2.1 AUFBAU DER VERWENDETEN DRUCKWECHSELAUTOKLAVEN

Die Entkeimungsversuche wurden an zwei verschiedenen Hochdruckautoklaven durchgeführt. Erste orientierende Versuche fanden mit der Versuchsanlage HTM-P 500 ml der Firma Premex (Lengnau, Schweiz) am Institut für Nichtklassische Chemie e.V. in Leipzig statt. Der Autoklav war für Drücke bis 1.000 bar und Temperaturen bis 450°C konzipiert und hatte ein Fassungsvermögen von 500 ml. Durch einen höhenverstellbaren und in der Drehzahl regelbaren Propellerrührer konnte der Gaseintrag in das flüssige Medium unterstützt werden. Der Autoklav verfügte darüber hinaus über einen temperierbaren Mantel, wodurch einerseits die durch den Gaseintrag entstehende Wärme kompensiert werden konnte und andererseits Prozesstemperaturen von minimal 10°C realisierbar waren. Zur Befüllung des Autoklaven wurde ein Vakuum von 50 mbar angelegt und die zu behandelnde Flüssigkeit durch den entstandenen Unterdruck in die

Autoklavenkammer gesaugt. Die Gaseinleitung erfolgte direkt in die zu behandelnde Flüssigkeit. Ein in Reihe geschalteter Haskel-Gaskompressor (Haskel International, Burbank, USA) verdichtete dabei das Gas bis zum gewünschten Arbeitsdruck. Ein bis zum Autoklavengboden reichendes Steigrohr diente zur Entnahme der eingebrachten Flüssigkeit (Abb. 36). Für die Prozessüberwachung waren jeweils zwei Temperaturfühler und zwei Manometer installiert. Als Prozessgase kamen Stickstoff in der Qualität 5.0 und das Narkosegas Distickstoffoxid (medizinische Qualität) zum Einsatz. Darüber hinaus war eine Druckluftversorgung des Haskel-Multiplikators notwendig.

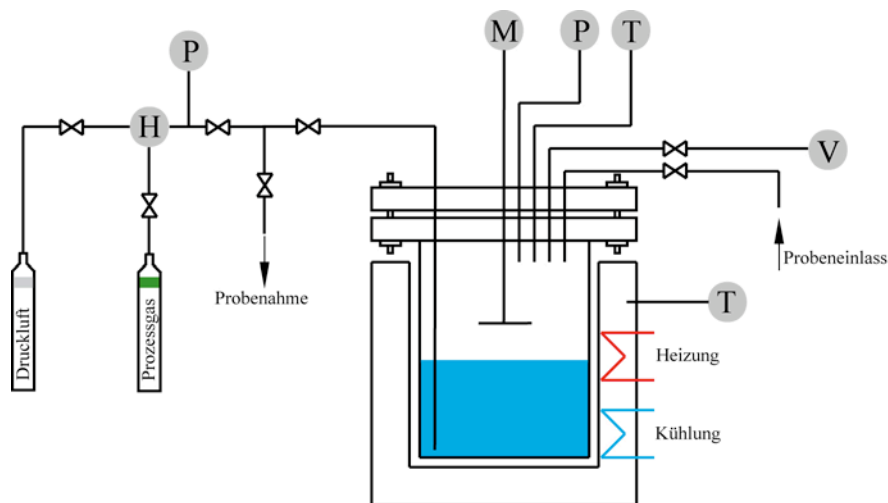


Abb. 36: Schematische Darstellung des Premex-Hochdruckautoklaven; H-Haskel-Gaskompressor; P-Manometer; M-Motor mit verstellbarem Rührer; T-Temperaturfühler; V-Vakuumpumpe

Bei den an der Universität Hamburg durchgeführten Druckwechselversuchen wurde ein Hochdruckreaktor der Firma Parr (Parr Instruments, Frankfurt/M.), ebenfalls in Kombination mit einem Haskel-Gaskompressor eingesetzt. Der Hochdruckreaktor verfügte über ein Fassungsvermögen von 1,3 l und war für Arbeitsdrücke bis 600 bar und Temperaturen bis 350°C ausgelegt. Der Gaseintrag erfolgte analog zum Premex-Autoklaven direkt in die zu behandelnde Flüssigkeit. Dadurch waren eine bessere Durchmischung und, aufgrund der größeren Kontaktfläche, eine schnellere Gleichgewichtseinstellung möglich (Abb. 37). Unterstützend kam ein Magnetrührer (Variomag, H+P Labortechnik, Oberschleißheim) zum Einsatz. Die Temperierung des Hochdruckreaktors erfolgte über eine Heizmanschette (Horst, Lorsch) in Kombination mit einer Parr Steuerungseinheit (Typ 4844). Die Proben wurden analog der Premex-Versuchsanlage über ein Steigrohr entnommen. Die Gesamtlänge des Steigrohrs bis zur Austrittsöffnung betrug 52,7 cm; bei einem Innendurchmesser von 41,5 mm ergibt sich daraus ein Volumen von 7,23 ml; davon entfielen 2,37 ml auf den drucklosen Bereich jenseits des Auslassventils.

Dieses Endstück wurde vor jeder Probenahme mit sterilfiltrierter Luft gespült. Die Prozessüberwachung erfolgte über zwei Temperaturfühler und ein analoges Manometer. Der Arbeitsdruck des Haskel-Gaskompressors wurde mittels 50 l-Druckluftflaschen aufgebaut. Für die Überführung der flüssigen Probe aus 1 l-Laborflaschen in den Reaktor wurde mit steriler Luft ein leichter Überdruck in den Laborflaschen erzeugt und die Probe in den Reaktorraum gedrückt.

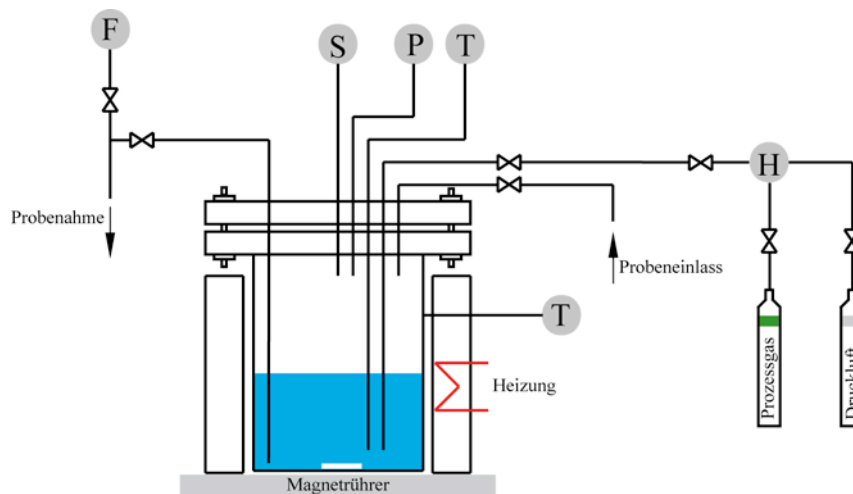


Abb. 37: Schematische Darstellung des Parr-Hochdruckautoklaven; H-Haskel-Gaskompressor; P-Manometer; T-Temperaturfühler; S-Sicherheitselement (Berstscheibe, 600 bar); F-Luftfilter mit einem nominalen Porendurchmesser von 0,45 μm

4.2.2.2 HERSTELLUNG UND BEHANDLUNG DER PROBEN

Volumina von 250 ml (Premex-Autoklav) bzw. 500 ml (Parr-Autoklav) Flüssig-nährmedium wurden mit einer Dauerkultur (vgl. Kap. 2.2.2.2) des jeweils zu untersuchenden Keims angeimpft und unter den keimspezifischen Bedingungen inkubiert (vgl. Kap. 2.2.2.3). Die erste Probe wurde direkt nach der Überführung der Keimsuspension in den Druckwechselautoklaven entnommen (Ausgangskeimzahl). Eine weitere Probenahme erfolgte direkt im Anschluss an die Druckbeaufschlagung sowie nach Druckhaltezeiten von 30, 60 und 120 min. Die Probenahme unter Druck erfolgte in fast allen Fällen durch Teilentspannung (2 bis 3 s) der Suspension in sterile 1.000 ml (Premex) bzw. 2.500 ml (Parr) Laborflaschen. Während der Gasbeladung, sowie eine Minute darüber hinaus, wurde die Probe mit einem Magnetrührer (Parr) bzw. einem Blattrührer (Premex) gerührt.

4.2.2.3 ASEPTISCHE VERSUCHSFÜHRUNG

Für die Untersuchungsreihen im Druckwechselautoklaven musste sichergestellt werden, dass es bei der Probenzuführung und -entnahme nicht zur Kontamination der Probe durch

Fremdkeime aus der Umgebungsluft kam. Zu diesem Zweck wurden die in Erlenmeyerkolben angezogenen Kulturen vor Versuchsbeginn in sterile Laborglasflaschen überführt, welche über sterile Schläuche mit dem Druckwechselautoklaven verbunden werden konnten. Die Überführung des flüssigen Mediums erfolgte dann, je nach Typ des Autoklaven, entweder durch eine leichte Druckbeaufschlagung mit sterilfiltrierter Luft (Parr) oder durch Anlegen eines Vakuums im Autoklav (Premex).

Der Autoklav wurde nach Versuchsende durch dreimaliges Spülen der Probenkammer mit jeweils ca. 500 ml (Premex) bzw. 1.000 ml (Parr) demineralisiertem Wasser gereinigt. Um eine bessere Wärmeübertragung während der nachfolgenden Hitzesterilisation zu gewährleisten, verblieb das Wasser des letzten Spülgangs im Autoklaven. Die Hitzesterilisation mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf erfolgte bei 140°C für 2,5 h (Parr) bzw. bei 200°C für 1 h (Premex). Bei Erreichen der halben Sterilisationszeit wurden nacheinander die Ventile der Probenzu- und -abführung für ca. 1 min geöffnet und so das Rohrleitungssystem mit gespanntem Wasserdampf (Probenzuführung) bzw. 140 oder 200°C heißem Wasser gespült. Zur Überwachung des Sterilisationsprozesses wurde nach dem Abkühlen des Systems das im Autoklaven verbliebene Wasser steril entnommen und mikrobiologisch untersucht (Spatelplattenverfahren).

4.2.2.4 STAMMHALTUNG UND WACHSTUMSBEDINGUNGEN

Vgl. Kap. 2.2.2.2 und 2.2.2.3

4.2.2.5 MIKROSKOPISCHE VERFAHREN

Vgl. Kap. 2.2.2.6 und 2.2.2.7

4.2.2.6 KEIMZAHLBESTIMMUNG NACH LIVE/DEAD-FÄRBUNG

Die Keimzahlbestimmung wurde zur Überprüfung der Startkeimzahl vor Versuchsbeginn und zu jeder Probenahme anhand der optischen Dichte durchgeführt (Kap. 2.2.2.4). Parallel dazu wurde die Lebendzellzahl jeder Probe nach dem Spatelplattenverfahren bestimmt (2.2.2.5).

Eine zusätzliche quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung erfolgte retrospektiv anhand der mikroskopischen Bilder durch Auszählen der Zellen. Für die räumliche Begrenzung des auszählenden Bereichs wurden die Bilder mit einem Messraster versehen. Je nach verwendeter Vergrößerung ergaben sich Quadranten verschiedener Fläche (Abb. 38). Die Auswahl des geeigneten Messrasters erfolgte in Abhängigkeit von Größe und Anzahl der Zellen. Je Probe wurden insgesamt drei Auszählungen an

verschiedenen Bildern vorgenommen. Pro Auszählung wurden bei 100-facher Vergrößerung und bei 400-facher Vergrößerung (kleines Messraster) vier Quadranten berücksichtigt, bei 400-facher Vergrößerung (großes Messraster) und bei 1.000-facher Vergrößerung der jeweils vollständige Quadrant. Bei Zellen, die auf der Quadrantengrenze lagen, wurden nur jene auf der linken bzw. unteren Begrenzung miterfasst.

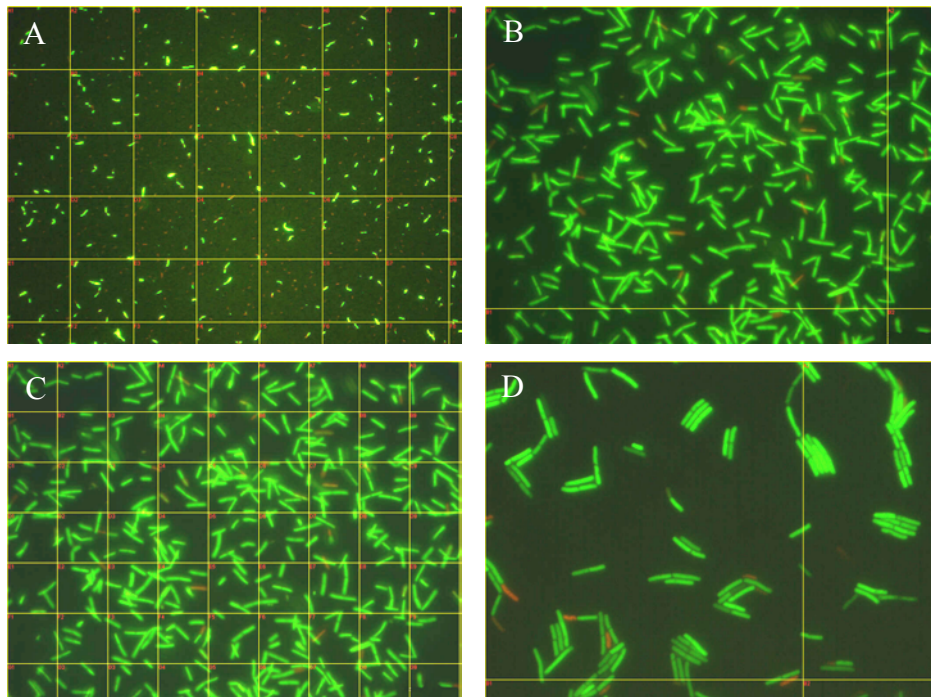


Abb. 38: Messraster zur quantitativen Auswertung der Live/Dead-Färbung; A: bei 100-facher Vergrößerung, Quadrantengröße 100x100 µm; B bei 400-facher Vergrößerung, Quadrantengröße 120x160 µm; C bei 400-facher Vergrößerung, Quadrantengröße 20x20 µm; D bei 1.000-facher Vergrößerung, Quadrantengröße 50x50 µm

Die Zellkonzentration wurde unter Zugrundelegung folgender Formel berechnet:

$$c_t = \frac{n_{\text{Filter}}}{V_{\text{Filtrat}}} = \frac{n_{\text{Quadrant}} \cdot F_{\text{Filter}}}{F_{\text{Quadrant}} \cdot V_{\text{Filtrat}}} \quad [\text{Gl. 10}]$$

c_t	Konzentration zum Zeitpunkt t [KBE/ml]
n_{Filter}	Anzahl der Zellen pro Filter
V_{Filtrat}	filtriertes Volumen [ml]
n_{Quadrant}	Anzahl der Zellen pro Quadrant
F_{Quadrant}	Fläche des ausgezählten Quadranten
F_{Filter}	Gesamtfläche des Filters (490,87 mm ²)

Von jeder Probe wurden je nach Zellkonzentration 100 bis 1.200 Zellen ausgezählt. Daraus ergibt sich für die Aussagekraft des Lebend/Tot-Verhältnisses, dass ein Konzentrationsunterschied zwischen lebenden und toten Zellen von 3-4 Zehnerpotenzen erfasst werden

konnte. Eine homogene Verteilung der Zellen auf der Filteroberfläche vorausgesetzt, ist ein Fehler von $< 0,1$ % für das Lebend/Tot-Verhältnis zu erwarten.

4.2.2.7 DYNAMISCHE DIFFERENZKALORIMETRIE

Vgl. Kap. 2.2.2.9

4.2.2.8 VISKOSITÄTSMESSUNG

Die Bestimmung der dynamischen Viskosität der idealviskosen Flüssigkeiten CASO-Bouillon und isotone Kochsalzlösung erfolgte unter Verwendung eines Kapillarviskosimeters nach Ubbelohde im Klimaraum nach einer 48-stündigen Temperaturausgleichzeit bei $21,5^{\circ}\text{C}$. Zur Bestimmung der Gerätekonstante wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Parallel dazu wurde die Dichte der vermessenen Substanzen mittels Flüssigkeitspyknometer (50 cm^3) bestimmt. Auch hierfür wurden die Flüssigkeiten und Glasgeräte zunächst für 48 h im Klimaraum bei derselben Temperatur gelagert.

Der Viskositätswert strukturviskoser Systeme, zu denen auch das Aerosil[®]-Gel zählt, stellt eine Funktion der Schubspannung bzw. der Deformationsgeschwindigkeit dar. Daher bedurfte es bei der Charakterisierung der Fließeigenschaften der Aufnahme eines Rheogramms. Zu diesem Zweck wurden Scherversuche mit einem Haake RheoStress 1 Rotationsviskosimeter (Thermo Electron, Karlsruhe) bei 20°C durchgeführt. Die Temperierung erfolgte mit einem Haake Phönix II Thermostat (Thermo Electron, Karlsruhe). In Abb. 39 sind die Ergebnisse der mit 10 %igem Aerosil[®]-Gel durchgeführten Messungen dargestellt.

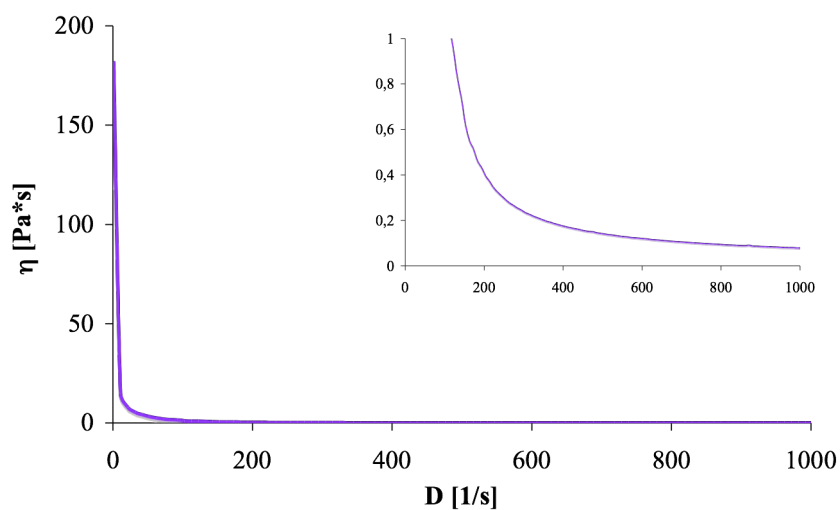


Abb. 39: Rheogramm einer 10 %igen Aerosil[®]-Suspension, aufgenommen mit einem Kegel-Platte-Viskosimeter bei 20°C (\bar{x} , $n=6$)

Die Versuche wurden mit einer Kegel-Platte-Messeinrichtung (Messplattenaufsatz 35, Rotor C 35/2, Thermo Electron, Karlsruhe) durchgeführt. Zunächst wurde die Probe für 5 min bei 20°C temperiert und im Anschluss für 3 min bei einer Deformationsgeschwindigkeit von $2,0 \text{ s}^{-1}$ vorgeschert. Die eigentliche Messung erfolgte danach im Hysteresisverfahren ($D = 0-1.000 \text{ s}^{-1}$). Die Beschleunigung des Kegels wurde dabei so gewählt, dass nach 100 s die höchste Drehgeschwindigkeit erreicht war. Nach einer sich anschließenden konstanten Scherung über eine Zeit von 30 s wurde die Abwärtskurve aufgezeichnet. Das erhaltene Rheogramm war charakteristisch für einen thixotropen Körper.

Da während der Entspannungsphase im Druckwechselverfahren sehr hohe Scherkräfte wirken, wurde für alle weiteren Betrachtungen nur die bei höchster Deformationsgeschwindigkeit erhaltene Viskosität berücksichtigt.

4.3 ERGEBNISSE

4.3.1 PROZESSGAS STICKSTOFF

Der hohe Anteil an elementarem Stickstoff in der Atmosphäre (ca. 78 % V/V) ermöglicht durch fraktionierte Destillation flüssiger Luft eine kostengünstige Darstellung der Reinform in großen Mengen. Im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit eines späteren Routinebetriebs des Druckwechselfahrens ist dies ein entscheidender Faktor. Darüber hinaus kann auf eine aufwändige Rückgewinnung des Prozessgases sowohl aus Sicht der Wirtschaftlichkeit als auch des Umweltschutzes verzichtet werden. Dies berücksichtigend, wurden umfangreiche Untersuchungen zur Eignung von Stickstoff als Prozessgas für das Druckwechselfahren durchgeführt.

Stickstoff liegt bei Raumtemperatur im gasförmigen, überkritischen Zustand vor, d. h. eine Verflüssigung ist im Bereich der untersuchten Prozessparameter nicht möglich (Tab. 13). Da bei allen Druckwechselfahrensversuchen sowohl der Druck als auch die Temperatur oberhalb des kritischen Punktes liegen, ist von einem fluiden Zustand des Stickstoffs auszugehen. Die hohe Dissoziationsenergie der N₂-Dreifachbindung hat eine extreme Reaktionsträgheit des Stickstoffmoleküls zur Folge, was einen protektiven Einfluss auf die Stabilität des Sterilisationsgutes erwarten lässt. Stickstoff weist im Vergleich mit dem ebenfalls untersuchten Distickstoffoxid eine deutlich schlechtere Wasserlöslichkeit auf. Somit ist einerseits die für einen bestimmten Prozessdruck notwendige Gasmenge geringer und damit verbunden die durch Kompressionsarbeit eingebrachte Wärmemenge. Andererseits kommt es jedoch zu einer deutlichen Verringerung des während der Entspannung zur Verfügung stehenden Gases.

Tab. 13: Physikalische Eigenschaften von Stickstoff [153]

Molare Masse [g/mol]		28,013
Kritischer Punkt	Temperatur [K]	126,26
	Druck [bar]	34,1
Tripelpunkt	Temperatur [K]	63,15
	Druck [bar]	0,1246
Siedepunkt (bei 1,013 bar) [K]		77,36
Ostwald'scher Löslichkeitskoeffizient (Wasser)	L _{10°C; 1,013 bar}	0,0196
	L _{25°C; 1,013 bar}	0,0159
	L _{40°C; 1,013 bar}	0,0140

In Abb. 40 ist die Löslichkeit von Stickstoff in Wasser bei unterschiedlichen Drücken und Temperaturen dargestellt. Ein deutlicher Unterschied zwischen der nach dem Henry'schen Gesetz berechneten und der tatsächlichen Löslichkeit ist bereits bei Drücken oberhalb von 25 bar zu beobachten. Mit steigendem Druck verstärkt sich dieser Unterschied; so beträgt die tatsächlich gelöste Gasmenge bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 25°C nur ca. die Hälfte der berechneten Menge. Aufgrund der Expansionsneigung von Gasen nimmt mit steigender Temperatur zudem die Löslichkeit deutlich ab. Auch hier liegt, wie beispielhaft in Abb. 40 aufgeführt, kein linearer Zusammenhang zugrunde.

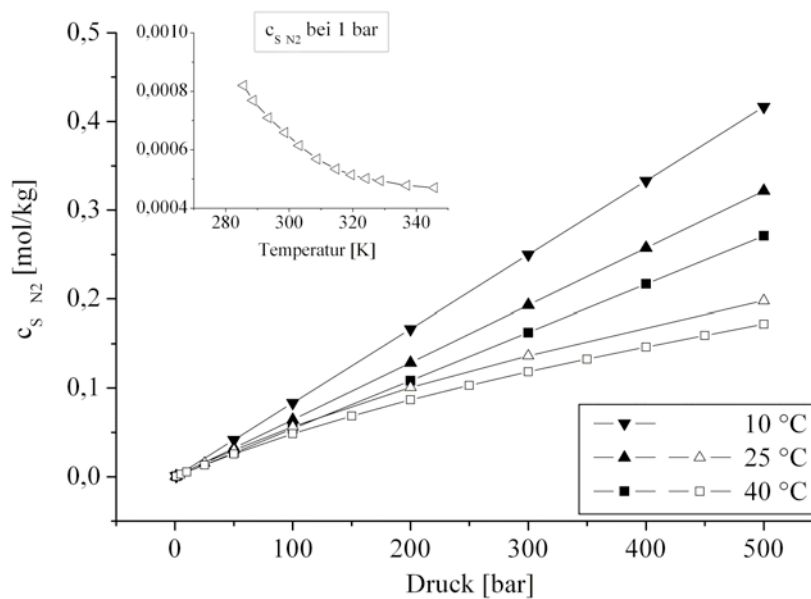


Abb. 40: Löslichkeit von Stickstoff in Wasser in Abhängigkeit von Temperatur und Druck. Die ausgefüllten Symbole stellen die druckabhängige Löslichkeit, berechnet nach dem Henry'schen Gesetz, dar. Die leeren Symbole entsprechen den der Literatur entnommenen Daten (Löslichkeit bei 25°C nach [154], Löslichkeit bei 40°C nach [148], temperaturabhängige Löslichkeit bei 1 bar nach [155]).

Die genaue Kenntnis der Gaslöslichkeit erlaubte es, den maximal möglichen Gaseintrag in die Mikroorganismenzellen zu berechnen. Als potentiell Solvens wurde nur das pro Zelle zur Verfügung stehende Wasser berücksichtigt. Da Trockenmassebestimmungen nicht erfolgten, wurde die in der Literatur angegebene Spanne von 70-85 % Wasseranteil für die Berechnung zugrundegelegt [16]. Die in Abb. 41 dargestellten Zusammenhänge während des Entspannungsvorgangs basieren auf einer durch 500 bar Stickstoffpartialdruck zur Verfügung stehenden Gasmenge. Für die Berechnung der Druck/Volumen-Verhältnisse wurden folgende Annahmen getroffen:

- während des äußeren Druckabfalls auf Atmosphärendruck kommt es im Zellinneren zu einer kompletten Freisetzung des gelösten Gases

- die Gasphase verhält sich ideal; es gilt das Boyle-Mariotte'sche-Gesetz (das Produkt aus Volumen und Druck ist bei konstanter Stoffmenge und Temperatur ebenfalls konstant)
- die Zelle ist ein geschlossenes System; kein Gas diffundiert während der Entspannung nach außen

Demnach hängt der resultierende intrazelluläre Druck ausschließlich von der elastischen Dehnbarkeit der Zelle und somit vom verfügbaren Volumen ab. Für gleiche intrazelluläre Gaskonzentrationen während der Druckhaltezeit gilt der dargestellte Zusammenhang zellgrößenunabhängig. Vor- oder Nachteile für das Überleben kleiner oder großer Mikroorganismen im Druckwechselprozess lassen sich daher nicht ableiten. Ein unterschiedliches Verhalten der Mikroorganismen ist in diesem Zusammenhang nur mit den unterschiedlichen viskoelastischen Eigenschaften der Mikroorganismenhüllen zu erklären.

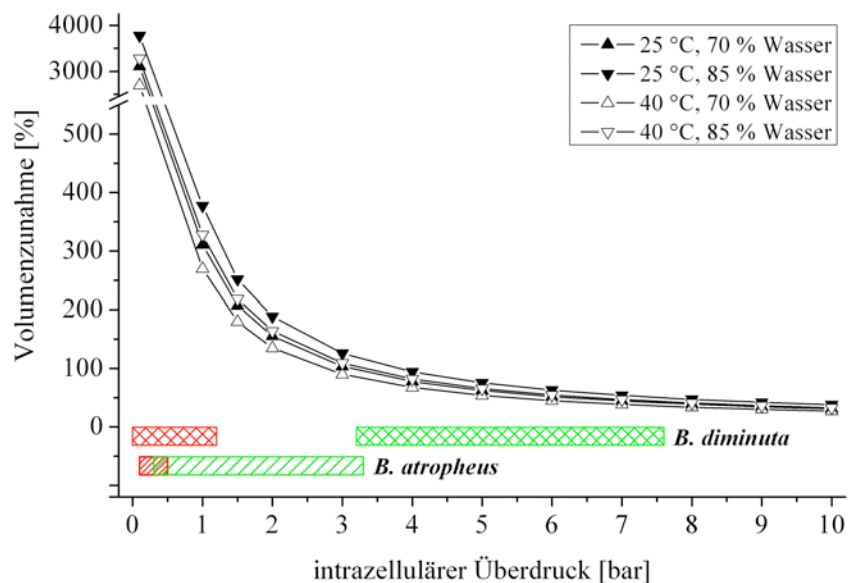


Abb. 41: Prozentuale Volumenzunahme in Abhängigkeit vom intrazellulären Überdruck bei Mikroorganismenzellen während der Entspannung von 500 bar auf Atmosphärendruck unter Verwendung von Stickstoff als Prozessgas. Die farbigen Bereiche stellen die Ergebnisse der AFM-Messungen dar (Rot: Druckbereich der zerplatzten Zellen, Grün: tolerierte maximale Druckbelastung nicht zerplatzter Zellen; vgl. Kap. 2.3.4).

Die dargestellten AFM-Ergebnisse zeigen, dass eine geringe Bruchfestigkeit nur durch eine sehr große Elastizität ausgeglichen werden könnte. Die untersuchten *B. diminuta* Zellen wiesen im Vergleich zu den *B. atropheus* Zellen in den durchgeführten AFM-Messungen eine deutlich höhere Toleranz gegenüber mechanischer Beanspruchung auf. So ist für diese eine Volumenzunahme von 50 % ausreichend, um den entstehenden Innendruck auf ein

tolerables Maß zu reduzieren. *B. atrophaeus* Zellen müssen für denselben Effekt ihr Volumen mindestens verdoppeln. Die gewählte Darstellung macht auch deutlich, dass die Temperatur und der tatsächliche Wasseranteil in der Mikroorganismenzelle bei höherer Drucktoleranz nur einen geringen Einfluss auf das Zerstörpotential haben, jedoch bei geringer Drucktoleranz durchaus das Ergebnis beeinflussen können. So ist zu vermuten, dass bei *B. atrophaeus* eine Erhöhung der Prozesstemperatur von 25°C auf 40°C mit einer Verschlechterung der Reduktionsraten einhergeht, *B. diminuta* hingegen keine wesentliche Veränderung aufweisen wird.

Neben der Gaslöslichkeit ist auch die Geschwindigkeit, mit welcher der Gaseintrag erfolgt, für den Druckwechselprozess von großer Bedeutung. Dies gilt besonders für die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Labormaßstab auf Prozessanlagen mit vorzugsweise kontinuierlicher Prozessführung. Die Geschwindigkeit des Gaseintrages in Wasser wurde in Vorversuchen unter Verwendung einer Apparatur zur Abfüllung von Lösungen unter Schutzgasatmosphäre untersucht (Abb. 42 A). Als Modellgase kamen Stickstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid zum Einsatz. Die Geschwindigkeit des Sauerstoffeintrages wurde bei Raumtemperatur unter Atmosphärendruck mit einem inoLab OxiLevel 2 Sauerstoffmessgerät (WTW, Weilheim) direkt bestimmt. Die Lösungsgeschwindigkeit von Stickstoff und Kohlendioxid konnte nur indirekt über die Abnahme der Sauerstoffkonzentration ermittelt werden.

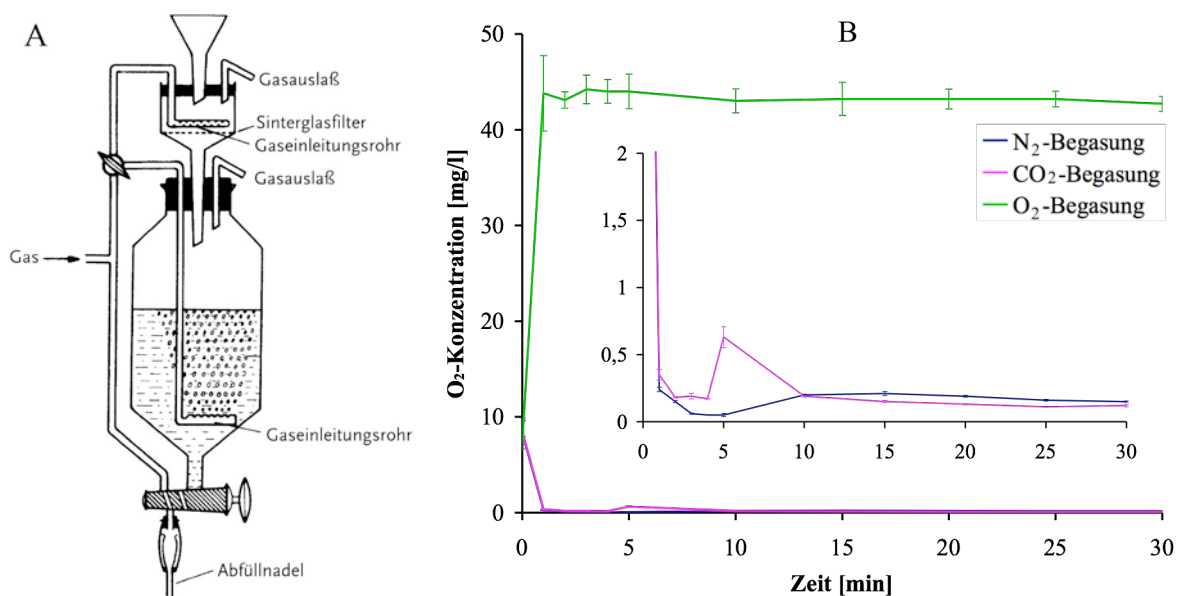


Abb. 42: Bestimmung der Lösungsgeschwindigkeit verschiedener Gase in demin. Wasser (RT; 1,013 bar). A: Versuchsapparatur [206]; B: Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Begasungsdauer ($\bar{x} \pm s$; n= 3)

Unabhängig von der Gasart konnte eine Gleichgewichtseinstellung innerhalb von einer Minute beobachtet werden (Abb. 42 B). Da die Lösungsgeschwindigkeit einer Kinetik 1. Ordnung folgt, druckunabhängig verläuft und die Methodik des Gaseintrages mit den Verhältnissen im Parr-Autoklav vergleichbar ist, kann dieses Ergebnis direkt auf das Druckwechselverfahren übertragen werden. Das für die Druckhaltezeit gewählte Prozessfenster von 5-120 min ist somit für den Gaseintrag in das wässrige Medium in jedem Fall, eine gute Durchmischung vorausgesetzt, als ausreichend zu bewerten.

4.3.1.1 ABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES VON DER ART DER MIKROORGANISMEN

4.3.1.1.1 GRAMPOSITIVE BAKTERIEN

Bacillus atropheus

Um die Aussagen über einen Einfluss der Art der Mikroorganismen über einen möglichst breiten Bereich abzusichern, wurden an insgesamt neun verschiedenen Mikroorganismenspezies Druckwechselversuche durchgeführt. Die Versuchsgruppe bestand aus fünf Vertretern grampositiver Bakterien, zwei Vertretern gramnegativer Bakterien und zwei Pilzen. Der insgesamt sehr umfangreiche Versuchsplan erlaubte es nicht, alle Versuche durch Wiederholung statistisch abzusichern. Um dennoch Aussagen über die Reproduzierbarkeit des Druckwechselverfahrens treffen zu können, wurden einzelne Versuche mehrfach wiederholt. Sowohl diese Wiederholungsversuche als auch spätere Versuche mit veränderten Prozessparametern erfolgten immer repräsentativ an *B. atropheus* und *B. diminuta* als Vertreter grampositiver bzw. gramnegativer Bakterien.

Wie Abb. 43 zu entnehmen ist, kam es bei der Wiederholung der Druckwechselversuche mit *B. atropheus* trotz sehr ähnlicher Ausgangskeimzahlen zu teilweise erheblichen Schwankungen bezüglich der Keimzahlreduktion. Eine tendenzielle Abnahme der Keimzahlreduktion bei fortschreitender Druckhaltezeit war jedoch in jedem Fall zu erkennen. Auch wurde bei allen Versuchen die höchste Reduktion bereits nach einer Haltezeit von fünf Minuten erreicht. Eine wesentliche Ursache für die Schwankungen der Keimzahlreduktionsrate ist in der nicht definierten, manuell erfolgten, Öffnung des Ventils während der Entspannung zu sehen. Des Weiteren kommen trotz gleicher Anzuchtbedingungen interindividuelle Unterschiede bezüglich Morphologie, Vegetationsphase und Zellalter bei den Surrogatorganismen als mögliche Ursache für diese Ergebnisse in Betracht.

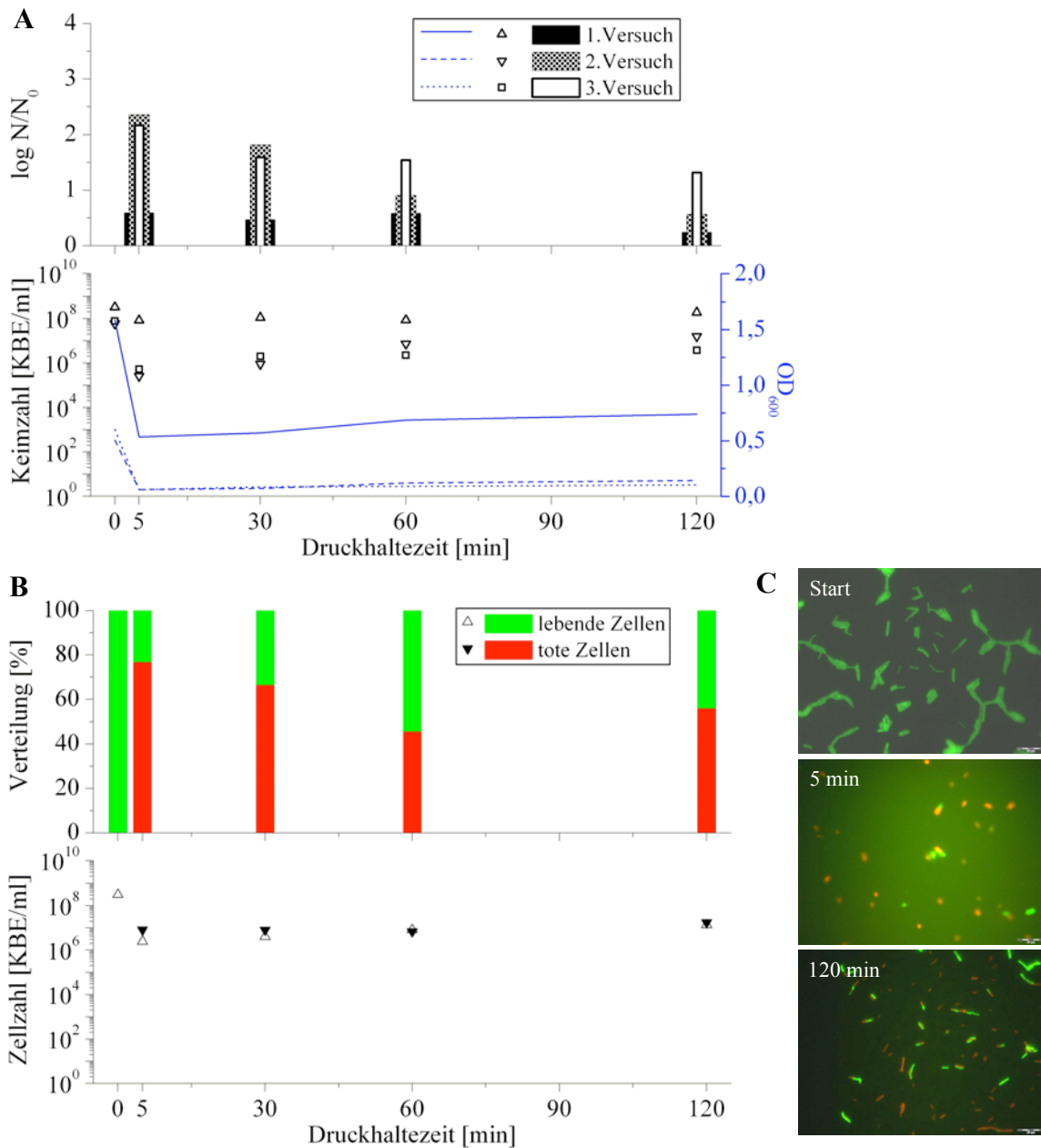


Abb. 43: Durch das Druckwechself Verfahren erreichte Keimzahlreduktion bei drei verschiedenen *B. atropheus* Kulturen; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung des 3. Versuchs mittels Live/Dead-Färbung; C: mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 400-fach

Die Auswertung der Live/Dead-Färbung ergab neben einer Reduktion der Gesamtzellzahl auch eine Zunahme an toten, nicht zerstörten Zellen, wobei jedoch die Reduktion der lebensfähigen Keime durch Zerplatzen überwog. Der beobachtete toxische Effekt von verdichtetem Stickstoff ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden. So konnte Arao et al. anhand von Wachstumsversuchen einen „minimalen Hemmdruck“ von 239 bar für *S. cerevisiae* bestimmen [156]. Auch ist seit längerem bekannt, dass Stickstoff unter Druck analgetische und anaesthetische Eigenschaften besitzt, was auf eine Interaktion mit

den Biomembranen bzw. den darin eingebetteten Proteinen der für die Reizweiterleitung verantwortlichen Nervenzellen zurückgeführt werden kann [157, 158]. Eine Interaktion des Stickstoffs mit der Mikroorganismenzellmembran ist daher ebenfalls sehr wahrscheinlich.

Die *B. atrophaeus* Versuche wurden einerseits an Proben durchgeführt, welche direkt im Anschluss an die Inkubation dem Druckwechselprozess unterworfen wurden und andererseits an Proben, die nach Erreichen ihrer optischen Solldichte für 2 h im Kühlschrank auf 4-5°C abgekühlt wurden (Abb. 44).

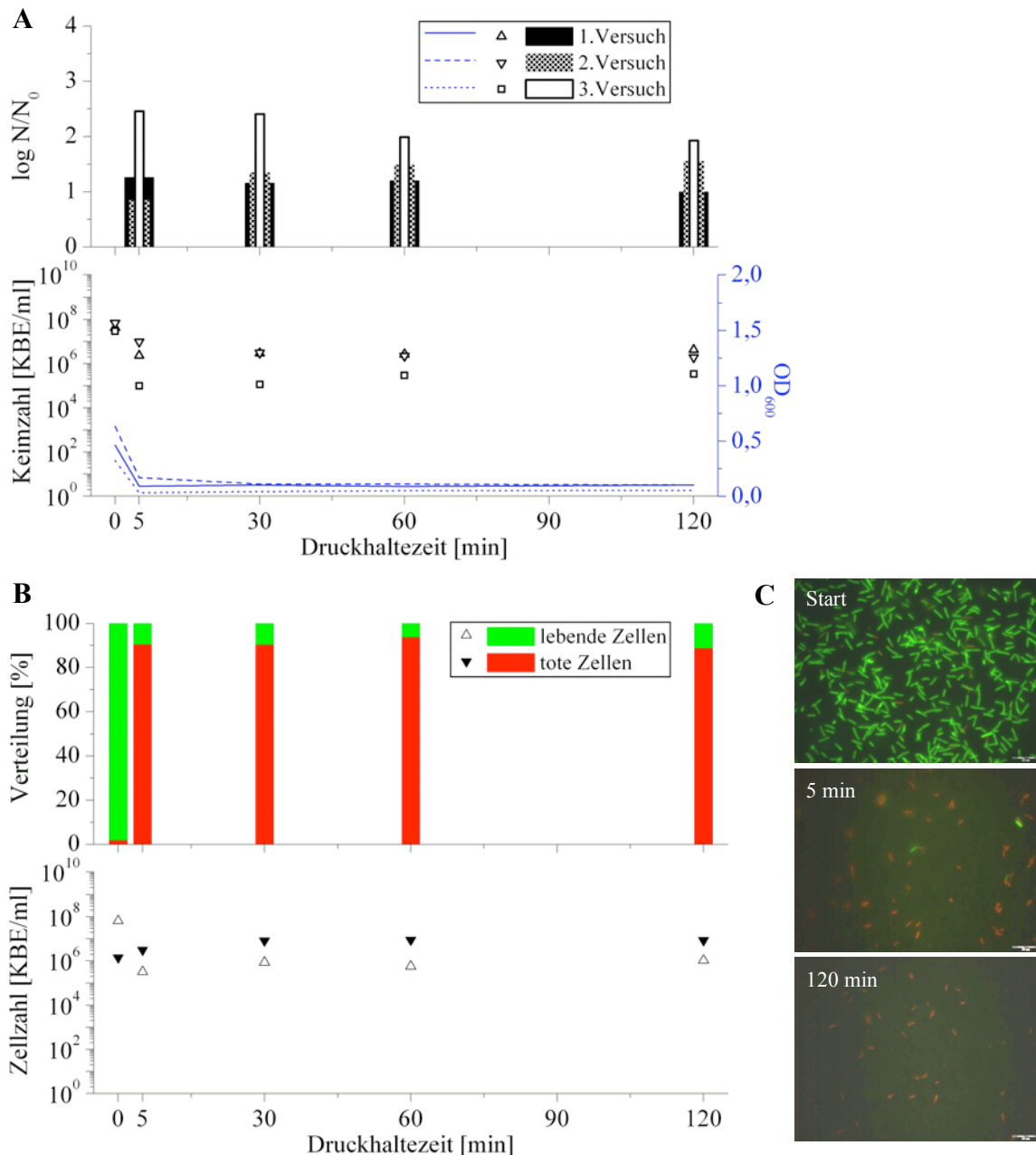


Abb. 44: Durch das Druckwechself Verfahren erreichte Keimzahlreduktion bei drei verschiedenen, für 2 h im Kühlschrank bei 4-5°C vorgekühlten *B. atrophaeus* Kulturen; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); **A:** Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; **B:** qualitative und quantitative Auswertung des 3. Versuchs mittels Live/Dead-Färbung; **C:** mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 400-fach

Es sollte geklärt werden, ob eine Reduktion der Stoffwechsellistung bzw. eine einsetzende Kälteschock-Antwort infolge der Temperaturenniedrigung zu einer veränderten Toleranz der Mikroorganismen gegenüber dem Druckwechselprozess führt. Auch hier waren erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen hinsichtlich der erzielten Keimzahlreduktion zu verzeichnen. Im Gegensatz zu den ungekühlten Proben ist jedoch keine Tendenz hinsichtlich der Keimzahlreduktion mit steigender Druckhaltezeit zu erkennen (Abb. 44 A). Die statistische Auswertung der Reduktionsraten ($\log N/N_0$) mit dem t-Test nach Student ergab bei gleichen Druckhaltezeiten keinen signifikanten Unterschied (Signifikanzniveau: 0,05) zwischen den gekühlten und ungekühlten Proben. Der Anteil an toten, nicht zerstörten Zellen betrug bei den vorgekühlten Kulturen nach der Druckwechselbehandlung ca. 90 % der insgesamt vorhandenen Zellen (Abb. 44 B). Da jedoch die 0-Probe, ähnlich der 0-Probe der nicht vorgekühlten Kulturen, fast keine toten Zellen aufwies (Abb. 44 C), ist zu vermuten, dass die schnelle Temperaturabsenkung selbst nicht toxisch auf die Zellen wirkt, sondern nur den bereits beschriebenen toxischen Effekt des Stickstoffs verstärkt. Insgesamt erhöht sich der Anteil toxischer Effekte am Gesamtbehandlungserfolg dadurch auf 50 %. Dennoch war keine Erhöhung der Keimzahlreduktion durch ein vorheriges Abkühlen der Probe zu erzielen und es wurde daher bei allen weiteren Versuchen auf diese Vorbehandlung verzichtet.

Bacillus pumilus

Die Versuche an *B. pumilus* und *G. stearothermophilus* wurden unter Verwendung des Premex-Autoklav durchgeführt. Das vergleichsweise kleine Reaktorvolumen gestattete es nicht, zu fünf verschiedenen Zeitpunkten eine Probe von ca. 70 ml zu entnehmen. Da jedoch die Ergebnisse der *B. atropheus* Versuche keine Erhöhung der Reduktionsrate durch eine verlängerte Druckhaltezeit erwarten ließen, wurde auf die beiden letzten Probenahmen verzichtet.

Die Ergebnisse der Druckwechselbehandlung von *B. pumilus* fielen trotz der vorhandenen Gemeinsamkeiten mit *B. atropheus* (Gram-Verhalten, Form) im Vergleich deutlich schlechter aus (Abb. 45). Weder die optische Dichte noch der Keimgehalt ließen eine nennenswerte Reduktion durch das Druckwechselverfahren erkennen. Eine Ursache für die unerwartet hohe Resistenz gegenüber den gewählten Prozessbedingungen kann in der vergleichsweise geringen Zellgröße und dem damit verbundenen günstigen A/V-Verhältnis von *B. pumilus* gesehen werden. Je Volumeneinheit steht den *B. pumilus* Zellen damit eine im Vergleich zu *B. atropheus* Zellen größere Oberfläche zur Verfügung und der während

des Entspannungsvorgangs entstehende Überdruck kann schneller durch Rückdiffusion des überschüssigen Gases abgebaut und die Zelle damit vor der Zerstörung geschützt werden.

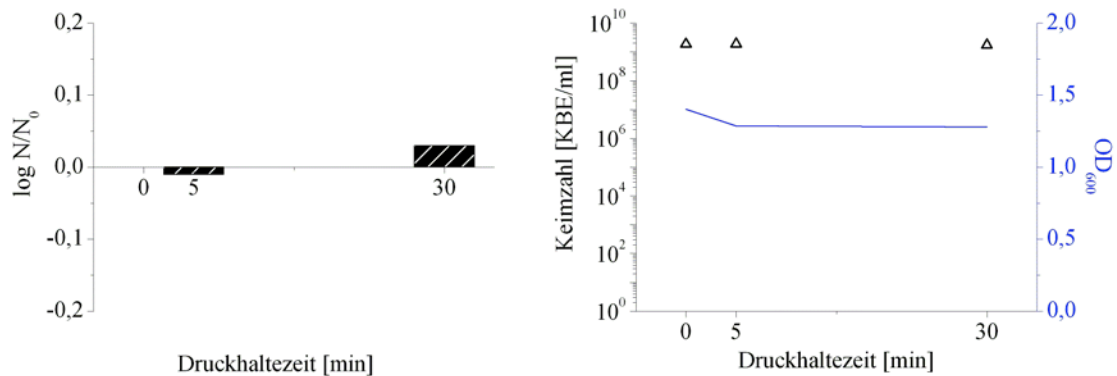


Abb. 45: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *B. pumilus* Kultur; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; 25°C (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang; siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte

Geobacillus stearothermophilus

Die Reduktionsergebnisse von *G. stearothermophilus* liegen ebenso wie der Zahlenwert des A/V-Verhältnisses zwischen denen von *B. atropheus* und *B. pumilus*. Da alle drei Spezies einen vergleichbaren Aufbau besitzen, liegt der für das Druckwechselverfahren wesentlichste Unterschied in der Zellgröße begründet. Beim Vergleich der A/V-Verhältnisse ergibt sich folgende Reihung:

$$B. atropheus < G. stearothermophilus < B. pumilus$$

Bei der Betrachtung der Reduktionsergebnisse ist eine exakte Umkehr der Verhältnisse zu verzeichnen. Je größer die pro Volumeneinheit zur Verfügung stehende Oberfläche, umso schneller ist der Druckabbau während der Entspannung und umso geringer das Schädigungspotential des freiwerdenden Gases. Damit ergibt sich für das Druckwechselverfahren die Forderung nach einer möglichst schnellen, explosionsartigen Entspannung. Darüber hinaus konnte auch hier die höchste Reduktionsrate bereits nach 5 min erzielt werden, was die Annahme eines schnell verlaufenden Diffusionsprozesses bestätigt (Abb. 46).

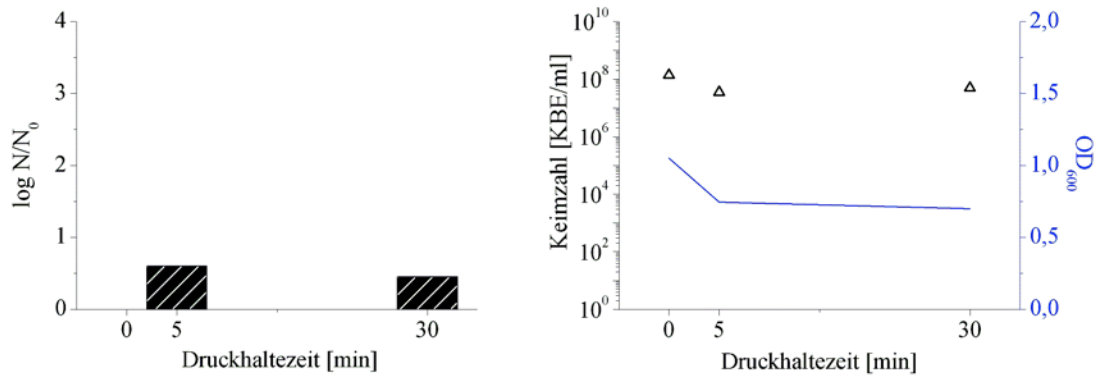


Abb. 46: Durch das Druckwechself Verfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *G. stearotherophilus* Kultur; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte

Staphylococcus aureus ssp. *aureus*

S. aureus wies wie fast alle untersuchten Keime nach 5 min die höchste Reduktionsrate auf. Jedoch kam es hier im weiteren Verlauf der Druckwechselbehandlung zu einer massiven Verschlechterung der Reduktionsrate. Die nach 120 min Druckhaltezeit entnommene Probe ergab sogar eine Erhöhung gegenüber der Ausgangskeimzahl, was auf ein weiteres Wachstum bei 500 bar schließen lässt (Abb. 47). Auch die Zunahme der optischen Dichte ist ein Beleg dafür. Für das Prozessgas Stickstoff ergibt sich daher ein optimales Zeitfenster von maximal 30 min.

Wie aus AFM-Messungen bekannt, entstehen bei der Zellteilung von *S. aureus* Löcher entlang des Septums [38, 44]. Diese Murosomen genannten Löcher können unter Umständen einen protektiven Einfluss auf die Zelle während der Gasexpansion ausüben, indem sie in der Funktion eines Ventils für einen schnellen intrazellulären Druckausgleich sorgen. Die Druckwechselergebnisse nach 60 und 120 min sind ein Indiz dafür.

Einen anderen Erklärungsansatz bietet die Auswertung der Live/Dead-Färbung. Diese ergab im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen an *B. atrophaeus* keinen toxischen Einfluss des Stickstoffs. Auffällig war hierbei, dass die für *S. aureus* typischen traubenförmigen Zellanordnungen mit zunehmender Druckhaltezeit an Struktur und Größe verlieren, so dass immer mehr Einzelzellen auftraten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Vereinzelung von Zellen eine Erhöhung der Gesamtzellzahl vortäuscht, da einerseits bei der Bestimmung der Lebendzellzahl vormals aggregierte Zellen, aus denen nur eine koloniebildende Einheit entstanden ist, nun als Einzelzellen erfasst werden und andererseits mit einer Desaggregation von Zellen die optische Dichte der Suspension ansteigen kann. Die quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung bestätigt diese

Annahme. Eine deutliche Reduktion der Gesamtzellzahl war nicht zu erkennen, was wiederum mit der Vermutung, dass eine große relative Oberfläche schlechte Reduktionsergebnisse zur Folge hat, im Einklang steht.

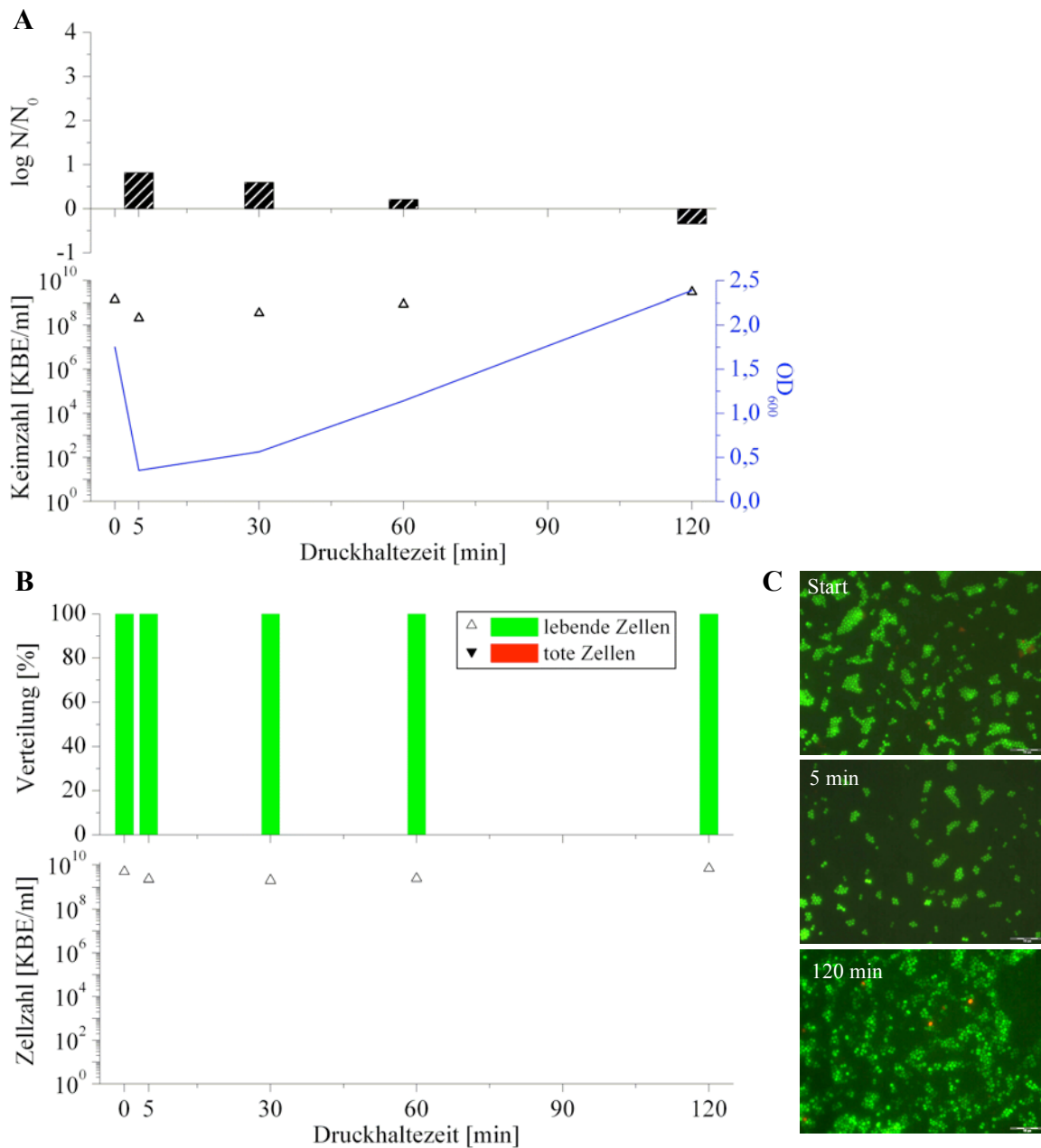


Abb. 47: Durch das Druckwechself Verfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *S. aureus* Kultur; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung; C: mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 1.000-fach

Clostridium sporogenes

Entgegen den bisherigen Versuchsbedingungen wurde bei den *C. sporogenes* Kulturen mit einer Startzelldichte von 10⁶-10⁷ KBE/ml gearbeitet, da für die sonst übliche Zelldichte von 10⁸ KBE/ml die Forderung nach exponentiellem Wachstum nicht mehr gegeben war.

Der maximale Behandlungserfolg konnte auch mit *C. sporogenes* bereits nach 5 min Druckhaltezeit erzielt werden (Abb. 48). Die Höhe der dabei erreichten Reduktionsrate ist ein weiteres Indiz für die Richtigkeit der bisherigen Hypothese, dass ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem A/V-Verhältnis und der maximal erreichbaren Reduktionsrate besteht. Mit einem A/V-Verhältnis ähnlich dem von *B. atrophaeus* wurden mit einer Reduktion von ca. 90 % der Ausgangskeimzahl auch ähnliche Reduktionsraten erreicht. Die mikroskopische Analyse mittels Live/Dead-Färbung war bei dem anaeroben Keim aufgrund des längerfristigen Luftkontakts während der Probenvorbereitung nicht möglich, weil eine Überlagerung des zu detektierenden toxischen Stickstoffeinflusses mit dem toxischen Einfluss des Luftsauerstoffs eine Differenzierung nicht zuließ. Die mit der Reduktion der Lebendzellzahl einhergehende deutliche Verminderung der optischen Dichte deutet aber auf ein Zerplatzen der Zellen als hauptsächlichen Schädigungsmechanismus hin.

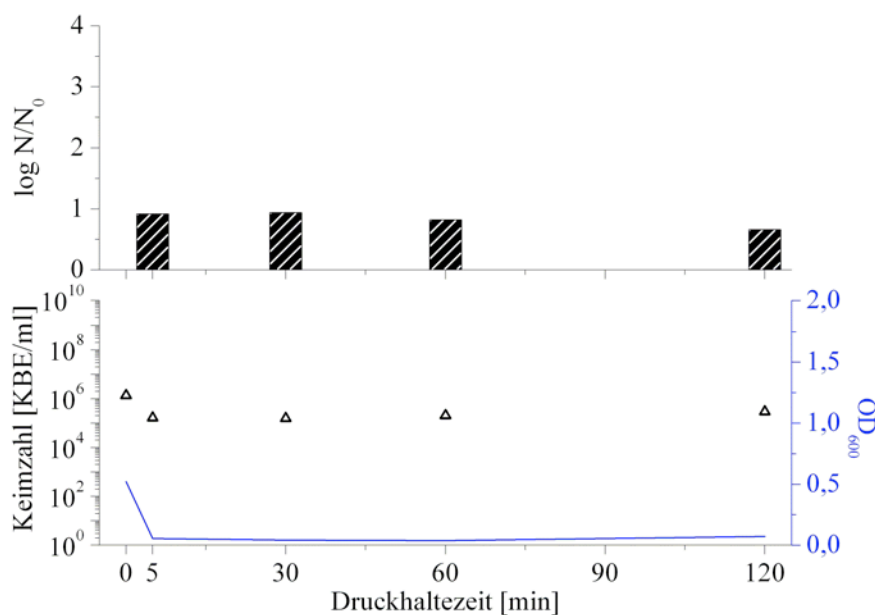


Abb. 48: Durch das Druckwechself Verfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *C. sporogenes* Kultur; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Gussplattenverfahrens und der optischen Dichte

4.3.1.1.2 GRAMNEGATIVE BAKTERIEN

Brevundimonas diminuta

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist im Vergleich zu den mit *B. atrophaeus* erhaltenen Daten deutlich besser. Auch hier geht eine Reduktion der Keimzahl mit einer Verringerung der optischen Dichte einher, was als Indiz für das Zerplatzen der Zellen während des Entspannungsvorgangs zu werten ist (Abb. 49 A).

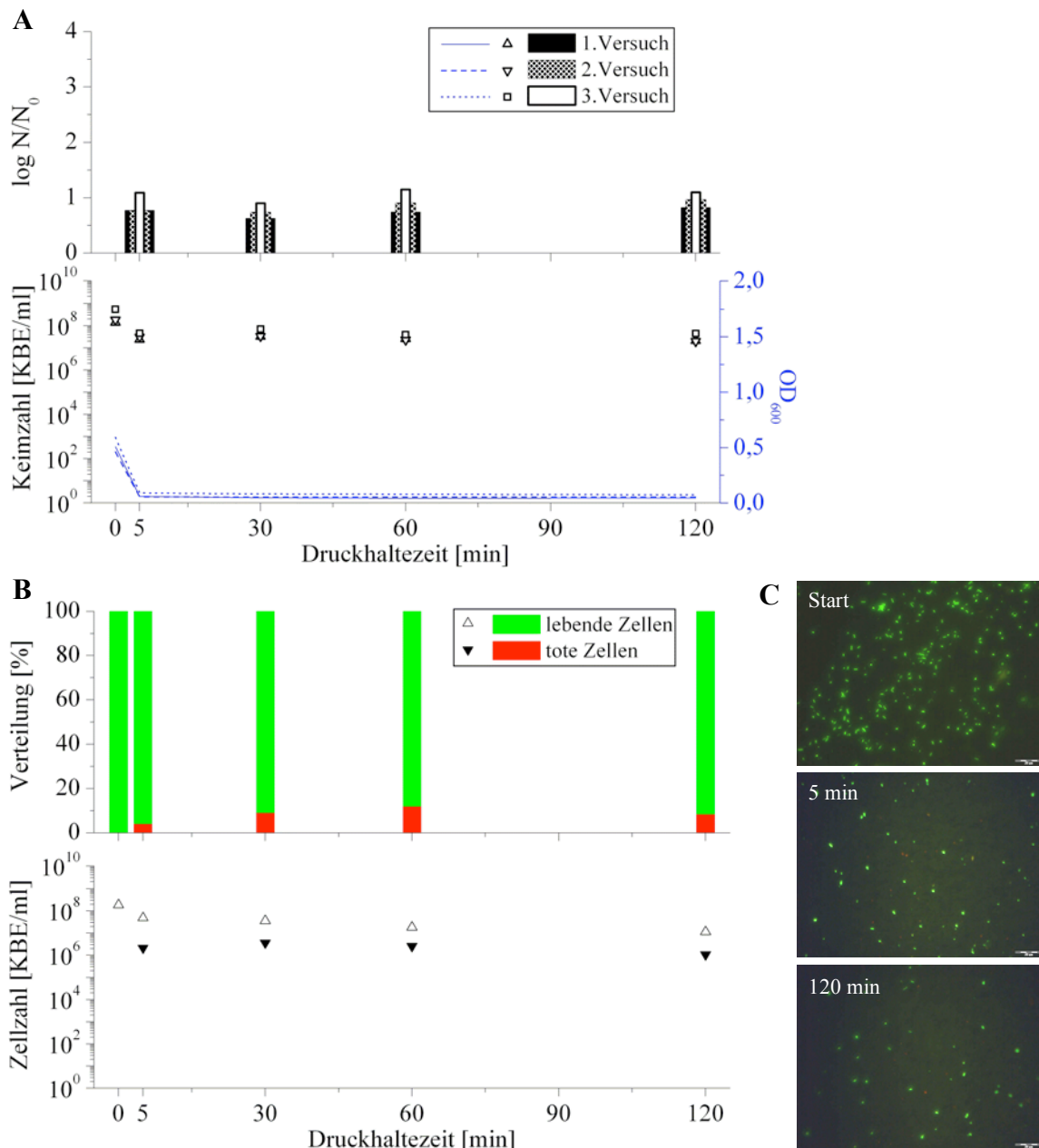


Abb. 49: Durch das Druckwechself Verfahren erreichte Keimzahlreduktion bei drei verschiedenen *B. diminuta* Kulturen; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung des 1. Versuchs mittels Live/Dead-Färbung; C: mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 400-fach

Darüber hinaus lässt sich auch hier erkennen, dass bereits nach 5 min die maximale Wirkung des Prozesses erreicht war. Die Gasdiffusion ist somit bereits nach kurzer Zeit abgeschlossen. Die aus den AFM-Messungen bekannte höhere Druckbeständigkeit der *B. diminuta* Zellen gegenüber den *B. atrophaeus* Zellen spiegelt sich im Ausmaß der Reduktionsrate wider. So liegt die mittlere Reduktionsrate nach 5 min bei nur 0,9 Zehnerpotenzen, während unter den gleichen Bedingungen eine mittlere Reduktion um 1,5 Zehnerpotenzen bei *B. atrophaeus* zu beobachten war. Neben der höheren Druck-

beständigkeit ist auch das A/V-Verhältnis mit 5,16 für eine Gasrückdiffusion während der Entspannung deutlich günstiger als bei *B. atrophaeus*. Darüber hinaus ist der toxische Einfluss des verdichteten Stickstoffs bzw. des hydrostatischen Drucks von 500 bar deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 49 B und C).

Pseudomonas aeruginosa

Die Druckwechselbehandlung von *P. aeruginosa* führte entgegen den Erwartungen zu einer deutlich geringeren Reduktionsrate als es für *B. diminuta* zu beobachten war (Abb. 50).

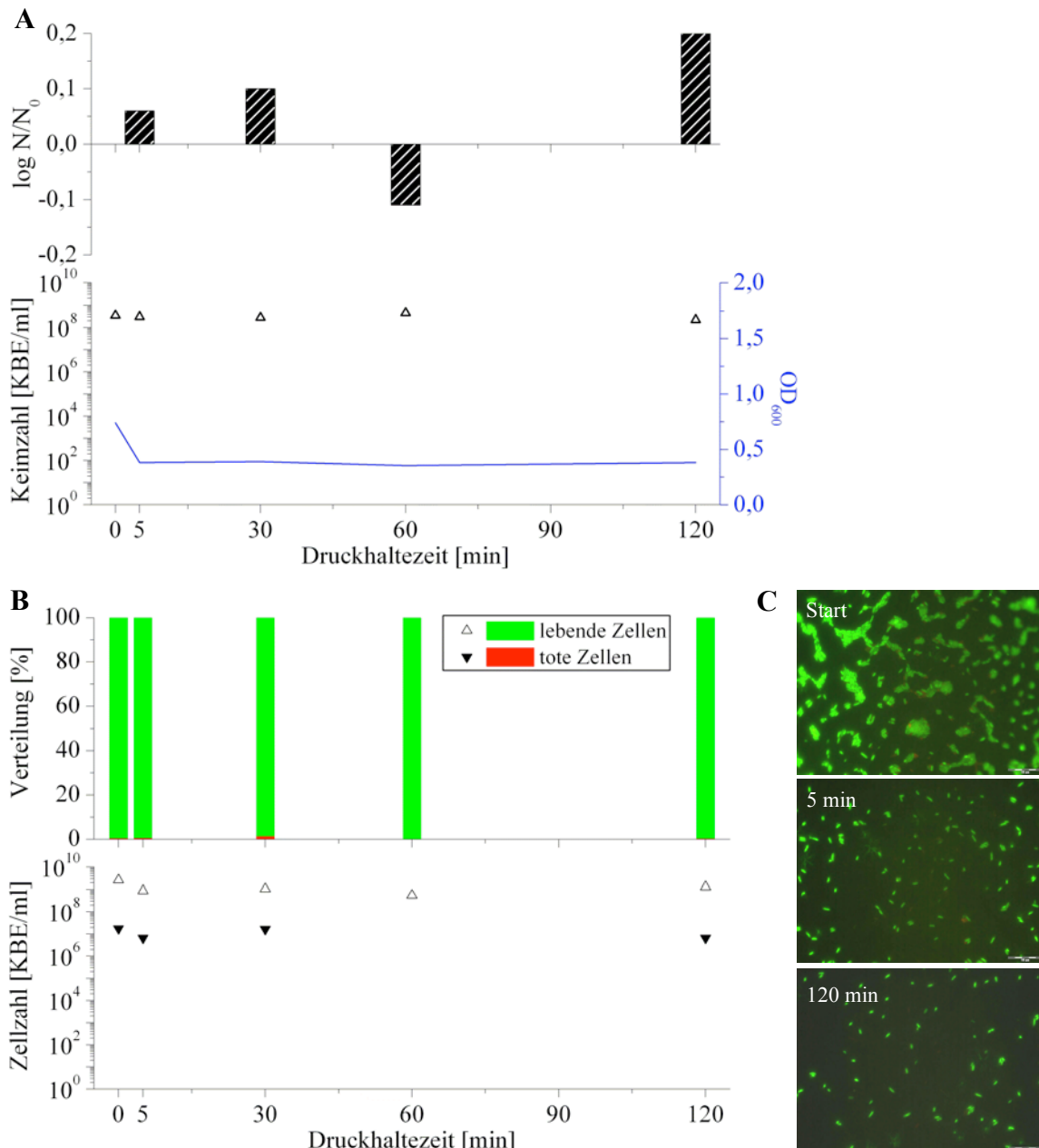


Abb. 50: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *P. aeruginosa* Kultur; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); **A:** Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; **B:** qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht; **C:** mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung, Vergrößerung: 1.000-fach

Dieses Ergebnis überrascht, da beide Keime neben einem vergleichbaren Zellwandaufbau auch näherungsweise die gleiche Zellform und -größe aufweisen. Trotz dieser Gemeinsamkeiten fiel die Keimzahlreduktion bei *P. aeruginosa* um den Faktor 10 schlechter aus. Eine Erklärung für dieses abweichende Verhalten könnte in der Ausbildung einer äußeren Kapsel um die äußere Zellmembran liegen [11]. Eine Verkapselung würde nicht nur eine Erhöhung des Diffusionswiderstandes bedeuten, sondern auch zu einer Stabilisierung der Zelle im Entspannungsprozess beitragen. Die Klärung dieses Sachverhaltes bleibt nachfolgenden Untersuchungen vorbehalten. Daneben ist, wie in Kap. 2.1.1.2 beschrieben, ein protektiver Einfluss von mechanosensitiven Kanälen durch eine kurzfristige Verringerung des Cytosols als Antwort auf den intrazellulären Druckanstieg denkbar.

4.3.1.1.3 PILZE

Aspergillus niger

Aus den bereits in Kap. 2.3.1.3 genannten Gründen kamen bei der Druckwechselbehandlung von *A. niger* nur angekeimte Sporensuspensionen zum Einsatz. Zunächst wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die Keimzahlreduktion untersucht. Dazu wurden Sporensuspensionen für 3, 8 und 12 h inkubiert und anschließend druckwechselautoklaviert. Die höchsten Reduktionsraten konnten dabei nach 8-stündiger Inkubation beobachtet werden. Die Erhöhung der Reduktionsrate gegenüber der Suspension mit 3-stündiger Inkubation war aufgrund der fortgeschrittenen Sporenaktivierung zu erwarten, die schlechten Reduktionsergebnisse nach 12-stündiger Inkubation jedoch nicht (Abb. 51 A). Hier kam es wahrscheinlich zu einer Überlagerung zweier gegensätzlicher Effekte: die Zahl an abgetöteten Zellen wurde durch die Zerstörung der mehrzelligen Hyphen unter Freisetzung einzelner intakter Zellen kompensiert und so ein Gleichgewichtszustand bei der Bestimmung der koloniebildenden Einheiten vorgetäuscht. Die in Abb. 51 B dargestellten mikroskopischen Bilder veranschaulichen dies. Eine weitere Schwierigkeit bei der Beurteilung der Reduktionsergebnisse lag in der zu unterschiedlichen Zeiten einsetzenden Sprossung der einzelnen Sporen. Das Ziel eines einheitlichen Vegetationsstatus konnte daher nicht realisiert werden. Dennoch waren die Versuche für eine erste Einschätzung bezüglich der Erfassbarkeit von *A. niger* im Druckwechselprozess sehr hilfreich. Dabei ist festzustellen, dass die für den Reduktionserfolg notwendige Gasdiffusion, vergleichbar mit den Ergebnissen der Bakterienkulturen, ebenfalls nach nur 5 min Druckhaltezeit sehr weit fortgeschritten war, weil die zu diesem Zeitpunkt erreichte Reduktionsrate nur noch eine

sehr geringe Steigerung mit weiter fortschreitender Druckhaltezeit erfuhr. Die Effektivität des Verfahrens betrug je nach Inkubations- und Druckhaltezeit maximal eine Zehnerpotenz.

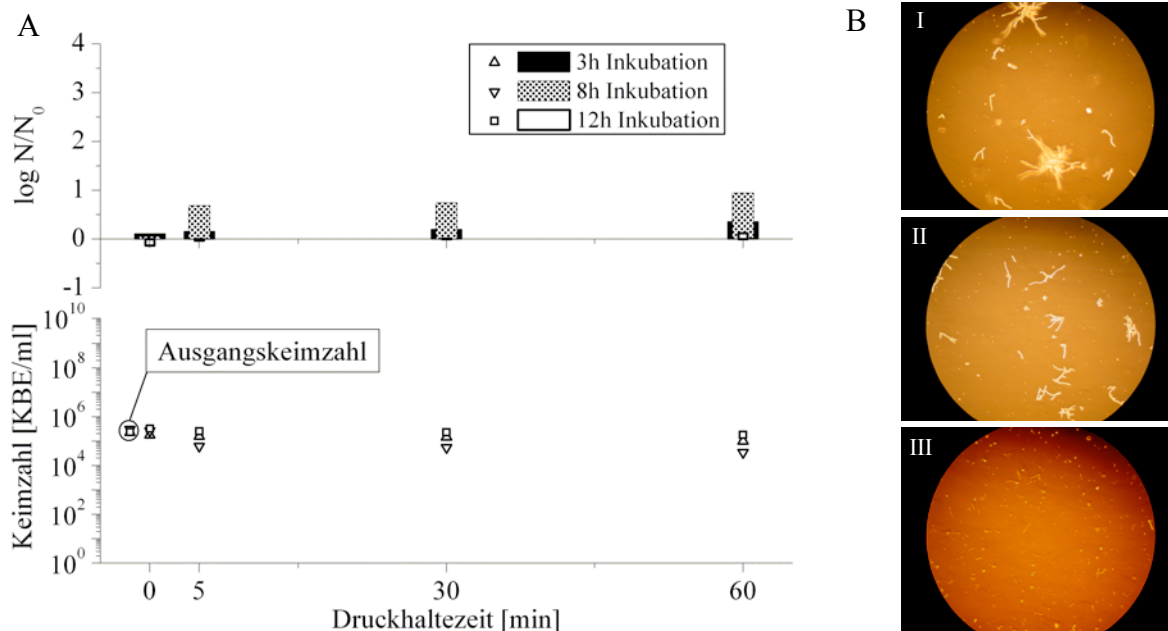


Abb. 51: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei *A. niger* Kulturen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Sporensuspensionen; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens (die Ergebnisse bei 0 min Druckhaltezeit stellen den Einfluss des Rührens ohne Druck dar); B: mikroskopisches Bild einer für 12 h inkubierten Sporensuspension (I – Startprobe, II – 2 min rühren ohne Druck, III – nach 60 min Druckhaltezeit, Vergrößerung: 12,5-fach)

Die Ergebnisse der nach 3 h Inkubationszeit druckwechselautoklavierten Sporensuspension wiesen zudem auf eine Resistenz von intakten bzw. in zu geringem Umfang aktivierten Sporen gegenüber dem Druckwechselverfahren unter den gewählten Bedingungen (500 bar, Stickstoff, 25°C) hin. Eine Verbesserung der Reduktionsergebnisse ist erst durch eine geeignete Sporenaktivierung zu erzielen. Diese kann, wie von Ludwig et al. beschrieben, durch eine Vorbehandlung mit hydrostatischem Druck erfolgen [100, 159]. Ein erster Hinweis für die Übertragbarkeit dieser Beobachtung auf das Druckwechselverfahren könnte die mit steigender Druckhaltezeit zunehmende Reduktionsrate sein.

Candida albicans

Entgegen den bisherigen Beobachtungen zeigte sich bei der Hefe *C. albicans* eine zeitlich verzögerte Wirkung des Druckwechselverfahrens, was auf eine verlangsamte Gasdiffusion in die Zellen schließen lässt (Abb. 52). Die insgesamt schlechte Ansprechbarkeit der Hefezellen auf den Druckwechselprozess bei Verwendung von Stickstoff als Prozessgas konnte auch von Bönsch et al. durch Untersuchungen an *S. cerevisiae* bestätigt werden [160]. Die Auswertung der Live/Dead-Färbung ergab darüber hinaus keine nennenswerte

Zunahme der toten, intakten Zellen, womit der Reduktionserfolg fast ausschließlich auf das Zerplatzen der Zellen während des Entspannungsvorgangs zurückzuführen ist. Ausgehend von dem für die Zellen ungünstigen A/V-Verhältnis war ein größeres Schädigungspotential zu erwarten. Die deutlich stabilere Pilzzellwand kompensierte jedoch diese geringe relative Oberfläche, so dass eine letale Zellschädigung während der Gasexpansion ausblieb.

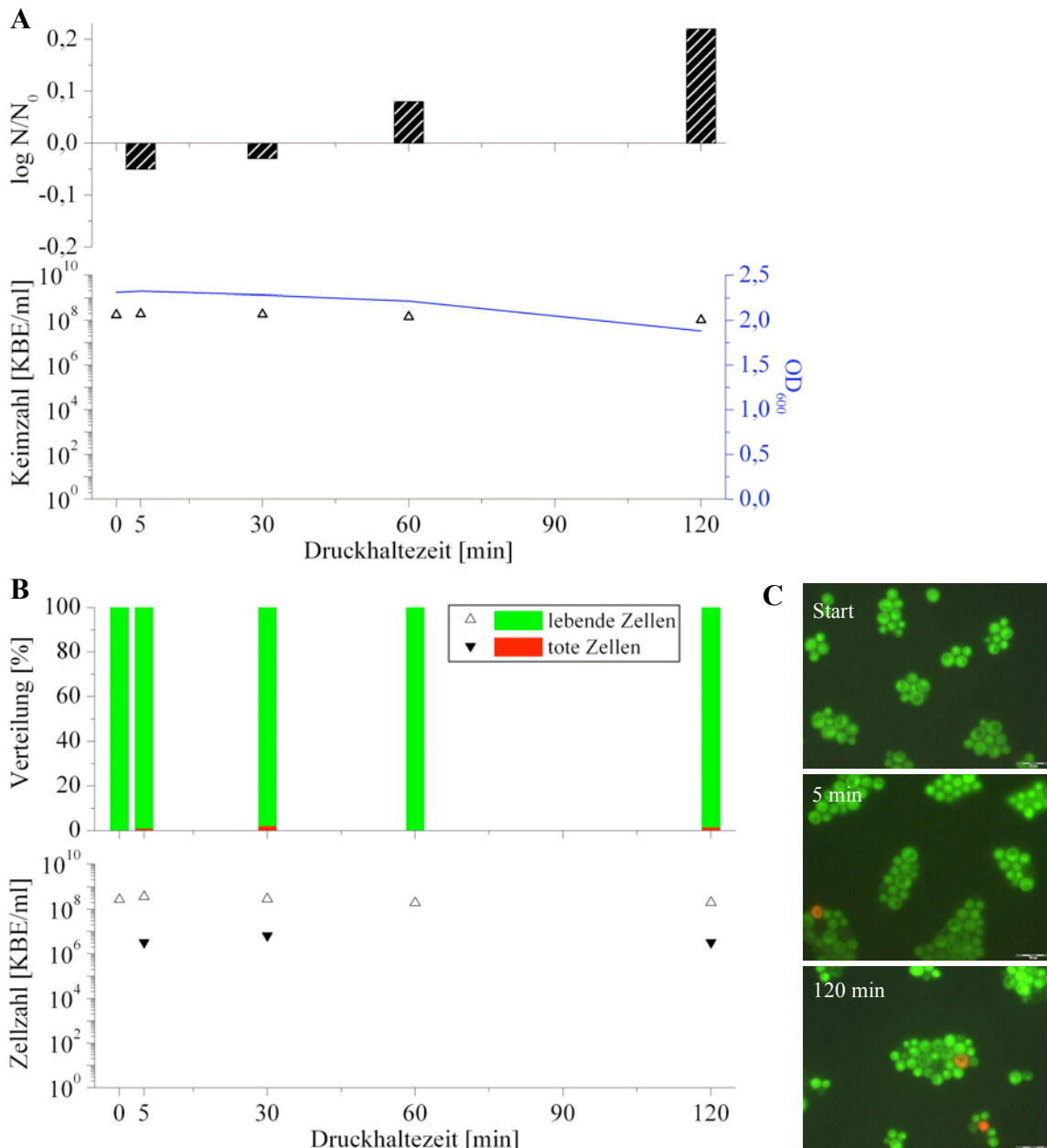


Abb. 52: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *C. albicans* Kultur; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

Kompressionsversuche an *S. cerevisiae* Einzelzellen ergaben eine Bruchdehnung von 80 % [79]. Eine Erhöhung des Zellumfangs in dieser Größenordnung hat eine Volumenzunahme

um den Faktor 5,8 zur Folge. Unter Berücksichtigung der in Kap. 4.3.1 dargestellten Zusammenhänge und Annahmen ergibt sich daraus bei der Entspannung von 500 bar auf 1 bar lediglich ein intrazellulärer Druckanstieg um ca. 0,5 bar. Somit ist auch durch eine Verlängerung der Druckhaltezeit keine wesentliche Steigerung der Reduktionsrate zu erwarten. Im Gegensatz zu diesen Überlegungen konnten Enomoto et al. bei *S. cerevisiae* Versuchen mit nur 40 bar Stickstoff und einer Prozesstemperatur von 40°C nach 4 h Druckhaltezeit Reduktionsraten von einer Zehnerpotenz beobachten [135]. Unklar ist jedoch, ob es sich hierbei um eine Zelinaktivierung durch Zerplatzen handelt oder die abweichenden Prozessbedingungen zu einem toxischen Effekt auf die Zellen führten.

4.3.1.1.4 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse des Druckwechselverfahrens mit Stickstoff als Prozessgas und einem Arbeitsdruck von 500 bar bei Raumtemperatur fielen in Abhängigkeit von der Art der untersuchten Mikroorganismen sehr unterschiedlich aus (Abb. 53). Daher war es auch nicht möglich, eine Klassifizierung nach druckwechselsensitiven und -resistenten Gruppen vorzunehmen. Sowohl bei den Bakterien als auch bei den Pilzen sprachen einige Vertreter gut auf das Druckwechselverfahren an, andere weniger gut. Eine allgemeine Aussage, ob grampositive oder gramnegative Keime besser durch das Druckwechselverfahren erfasst werden, war nicht möglich.

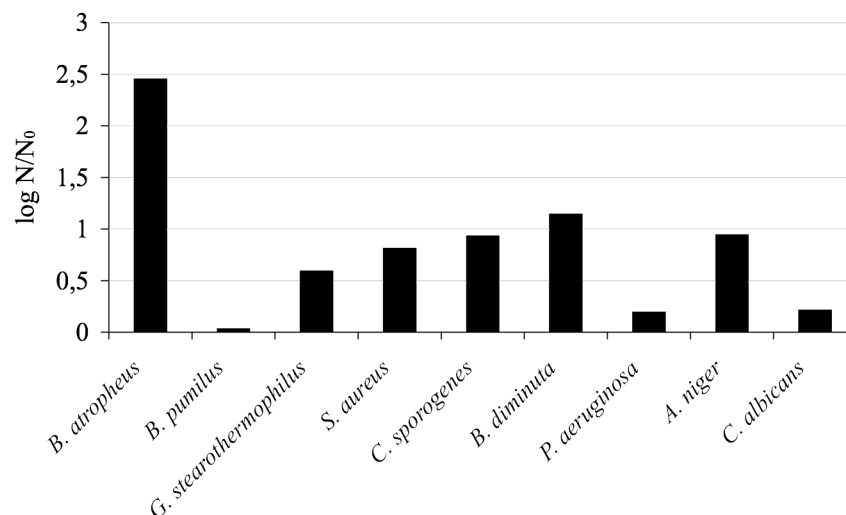


Abb. 53: Maximal erreichte Keimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Art der Mikroorganismen mit Stickstoff als Prozessgas bei RT und einem Druck von 500 bar

Insgesamt deutete sich jedoch an, dass der Gastransport in die Zelle innerhalb der ersten 5 min erfolgt, eine Steigerung der Reduktionsrate durch eine verlängerte Druckhaltezeit

war nur in Ausnahmefällen möglich. Des Weiteren war bei einigen Vertretern ein zusätzlicher toxischer Effekt in Form von toten, nicht zerstörten Zellen zu erkennen.

Inwiefern dieser toxische Effekt auf den verdichteten Stickstoff oder auf den hohen hydrostatischen Druck zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Die Bestimmung einer der Abtötung zugrunde liegenden Kinetik war ebenfalls nicht möglich, weil zum einen die zeitliche Auflösung - technisch bedingt - gerade in den ersten Minuten zu gering war (der Druckaufbau nahm je nach Füllungszustand der Stickstoff-Gasflasche bis zu 5 min in Anspruch) und zum anderen toxische Nebeneffekte den eigentlichen Druckwechseleffekt überlagerten. Die erreichten Abtötungsraten waren insgesamt für die an das Verfahren zu stellenden Anforderungen zu gering, so dass weitere Versuche unter Variation der Prozessparameter notwendig waren.

4.3.1.2 ABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES VON DER GELÖSTGASMENGE

In einer Messreihe mit *B. atropheus* Kulturen wurde der Einfluss der Gelöstgasmenge auf den Behandlungserfolg untersucht. Da die Gelöstgasmenge direkt vom Partialdruck des zu lösenden Gases abhängt, wurden Versuche bei 200, 300, 400 und 500 bar Stickstoffpartialdruck durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass Drücke unterhalb von 500 bar zu deutlich schlechteren Keimreduktionsraten bei kurzen Druckhaltezeiten führten (Abb. 54). Bei Druckhaltezeiten oberhalb von 30 min verringerte sich dieser Effekt im Vergleich zu den übrigen untersuchten Drücken jedoch deutlich. Die bei Drücken zwischen 200 und 400 bar behandelten Proben wiesen zeitunabhängig annähernd dieselben Keimreduktionsraten auf. Die Ergebnisse der Live/Dead-Färbung ergaben einen „minimalen toxischen Druck“ im Bereich von 500 bar. Niedrigere Prozessdrücke führten nur in geringem Umfang zu einem toxischen Effekt.

Der erwartete Zusammenhang zwischen Gelöstgasmenge und Keimzahlreduktion konnte bestätigt werden. Die Ergebnisse deuten darüber hinaus darauf hin, dass eine weitere Erhöhung der Gelöstgasmenge durchaus auch eine weitere Steigerung des Behandlungserfolges bewirken kann, da sich das Erreichen eines Plateaus bei der Reduktionsrate noch nicht abzeichnet. Es scheint eher der Fall zu sein, dass ein Prozessdruck von 500 bar die Untergrenze für ein effektives Prozessfenster darstellt.

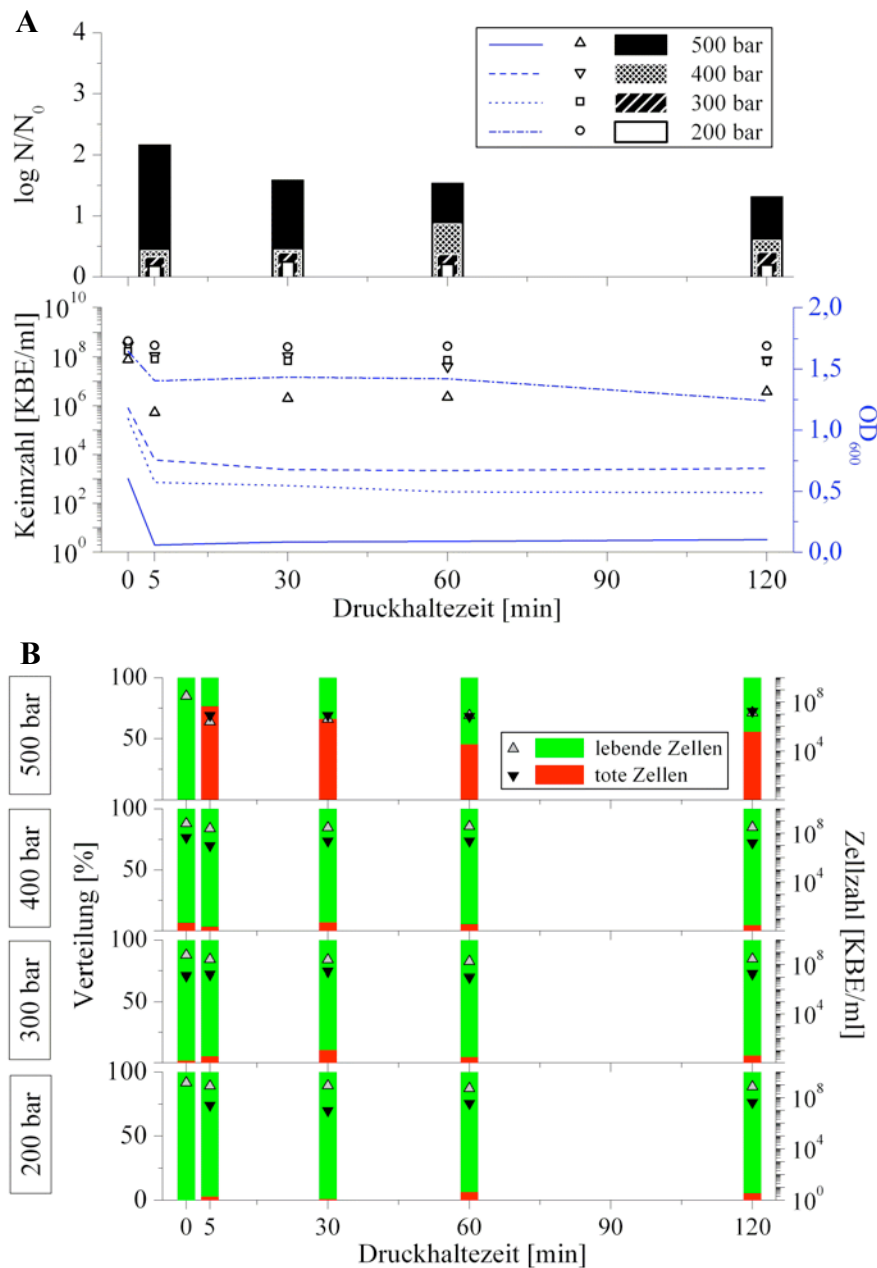


Abb. 54: Keimzahlreduktion verschiedener *B. atrophaeus* Kulturen in Abhängigkeit vom verwendeten Druck; Prozessgas: N_2 ; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

4.3.1.3 TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGS

Der Vorteil des Druckwechselverfahrens liegt in der nicht-thermischen Prozessführung verbunden mit einem geringen Energieeintrag in die zu entkeimende Flüssigkeit, um den Erhalt der Inhaltsstoffe zu gewährleisten. Die Frage nach dem Temperatureinfluss auf die Effektivität des Verfahrens ist dennoch von methodischer wie wirtschaftlicher Bedeutung. Führt ein moderater Temperaturanstieg zu einer Steigerung der Abtötungsrate bei gleichzeitigem Erhalt der Wirkstoffe, kann die durch Kompressionsarbeit und Lösungswärme eingebrachte Wärmeenergie im System verbleiben und muss nicht durch aktive

Kühlung abgeführt werden. Zur Einschätzung des Temperatureinflusses wurden Versuche bei 10, 25 und 40°C an verschiedenen grampositiven Bakterien und an *A. niger* als Vertreter der Gruppe der Pilze durchgeführt.

Bakterien

Aus der Gruppe der Bakterien wurden *B. atropheus*, *B. pumilus* und *G. stearothermophilus* hinsichtlich ihres Absterbeverhaltens untersucht. Bei *B. atropheus* Kulturen war ein besonders starker Einfluss niedriger Temperaturen (10°C) zu erkennen (Abb. 55). Vermutlich kommt es hier zu einer Verfestigung der Bakterienhülle und in diesem Zusammenhang zu einer Verringerung der elastischen Verformbarkeit der Zelle und einer stärkeren Schädigung während des Entspannungsvorgangs. Da zunächst eine Anpassung an die äußeren Bedingungen stattfand, wurde erst nach 30 min die maximale Keimzahlreduktion erreicht. Verglichen mit den Ergebnissen des 25°C-Versuches konnte bei 10°C eine Steigerung der Effektivität des Abtötungsprozesses um den Faktor 7 erzielt werden. Darüber hinaus ist eine Verminderung der Drucktoleranz als Folge einer einsetzenden „Kälteschock-Antwort“, wie sie auch für die vorgekühlten *B. atropheus* Proben diskutiert wurde, denkbar [9, 67, 161]. Die gegenüber dem 25°C-Versuch um die Hälfte geringere Keimzahlreduktion bei 40°C kann durch eine erhöhte Flexibilität der Bakterienhülle erklärt werden. Der Effekt der Fluidisierung ist dabei auf einen Phasenübergang der Phospholipiddoppelschicht von lamellar-gelartig zu flüssig-kristallin zurückzuführen. In der Literatur sind anhand von DSC-Untersuchungen an Phospholipiddoppelschichten Phasenübergangstemperaturen im Bereich von 40°C beschrieben [162]. Zudem kommt die verminderte Stickstofflöslichkeit bei 40°C als Ursache für eine verminderte Keimreduktion in Betracht. Analog dazu lässt sich auch eine Erhöhung der Reduktionsrate bei 10°C mit einer verbesserten Stickstofflöslichkeit erklären.

Verglichen mit den *B. atropheus* Daten ist die Keimzahlreduktion von *B. pumilus* bei allen Temperaturen deutlich geringer. Jedoch sind auch hier temperaturbedingte Unterschiede zu erkennen. So ist bei 40°C eine leichte Erhöhung der Keimzahlreduktion zu beobachten. Demgegenüber ist eine Temperaturabsenkung auf 10°C ohne Einfluss auf den Behandlungserfolg. Das stark unterschiedliche Verhalten der beiden *Bacillus* Spezies während des Druckwechselprozesses überrascht aufgrund der vielen Gemeinsamkeiten hinsichtlich Gramverhalten, Temperaturoptimum sowie Zellform. Eine Ursache kann jedoch in dem bereits beschriebenen A/V-Verhältnis liegen. Dieses fällt für *B. pumilus* aufgrund der geringeren Größe günstiger aus und gewährleistet somit eine leichtere

Rückdiffusion des bei der Entspannung überschüssigen Gases und dadurch einen schnelleren intrazellulären Druckausgleich.

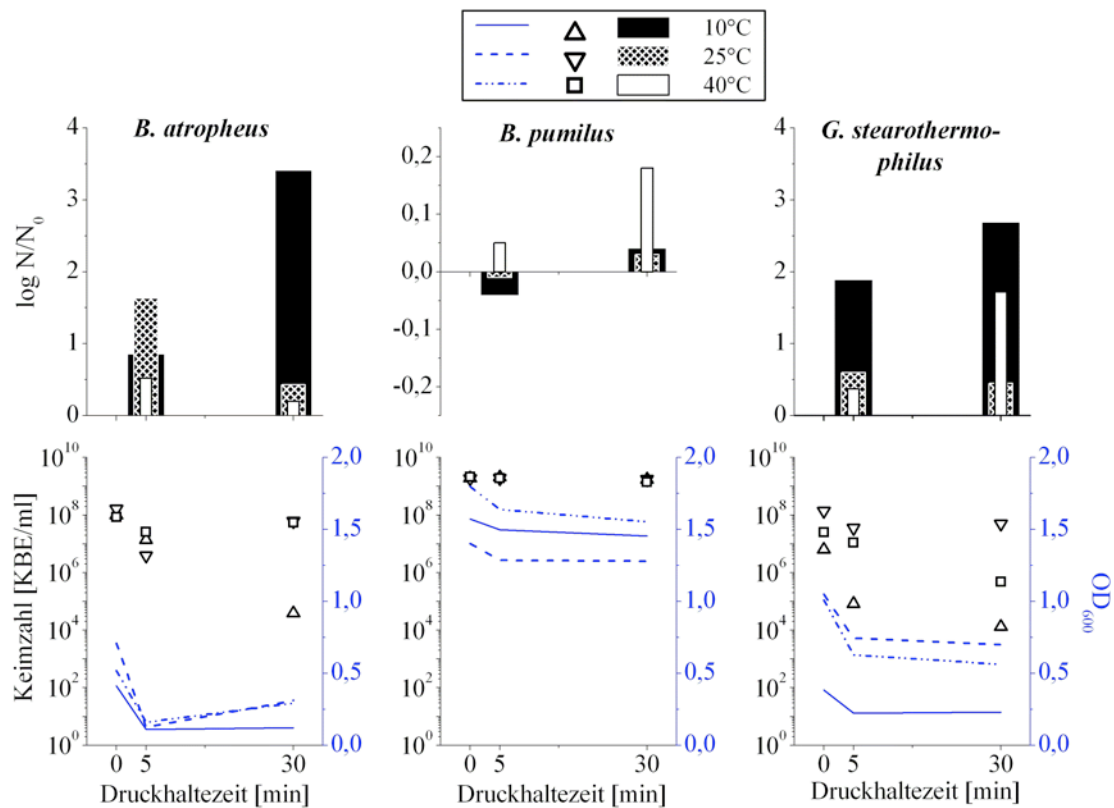


Abb. 55: Temperaturabhängige Keimzahlreduktion verschiedener grampositiver Bakterienkulturen; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang)

Die Herabsetzung der Prozesstemperatur bei *G. stearothermophilus* führte im Vergleich zum entsprechenden *B. atropheus* Versuch zu ähnlich hohen Reduktionsraten. Die Absenkung der Prozesstemperatur von 25°C auf 10°C hatte eine 6-fach höhere Keimzahlreduktion zur Folge. Eine Temperaturerhöhung um 15°C, wiederum von 25°C ausgehend, bedingte ebenfalls eine höhere Keimreduktion. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als dass der einzige thermophile Vertreter aus der Gruppe der untersuchten Bakterienspezies eine höhere Sensitivität gegenüber der Prozesstemperatur von 40°C aufweist als die mesophilen Keime *B. atropheus* und *B. pumilus*. Eine Ursache dafür könnte die Anwesenheit vieler in Teilung befindlicher Zellen sein, da die Prozesstemperatur von 40°C nahe dem Temperaturoptimum für das Wachstum von *G. stearothermophilus* (ca. 50°C) liegt. Die zeitliche Verzögerung bis zum Erreichen der maximalen Keimzahlreduktion von etwa 30 min wäre ebenfalls ein Indiz dafür. Insgesamt ist festzuhalten, dass eine von 25°C abweichende Prozesstemperatur in den meisten Fällen zu einer Erhöhung der Reduktionsrate führt.

Pilze

Als Vertreter der Pilze wurde *A. niger* für die Bewertung des Temperatureinflusses untersucht. Die Quantifizierung des Einflusses der Prozesstemperatur auf die Keimzahlreduktion erfolgte mit Sporensuspensionen, welche für 3 h inkubiert wurden. Auch hier kam es, wie bereits für die Bakterien beschrieben, zu höheren Reduktionsraten wenn die Prozesstemperatur nicht 25°C betrug (Abb. 56). Analog den Beobachtungen an *B. atrophaeus* und *G. stearothermophilus* sind auch hier besonders die Ergebnisse des 10°C-Versuches mit einer Vervierfachung der Reduktionsrate hervorzuheben.

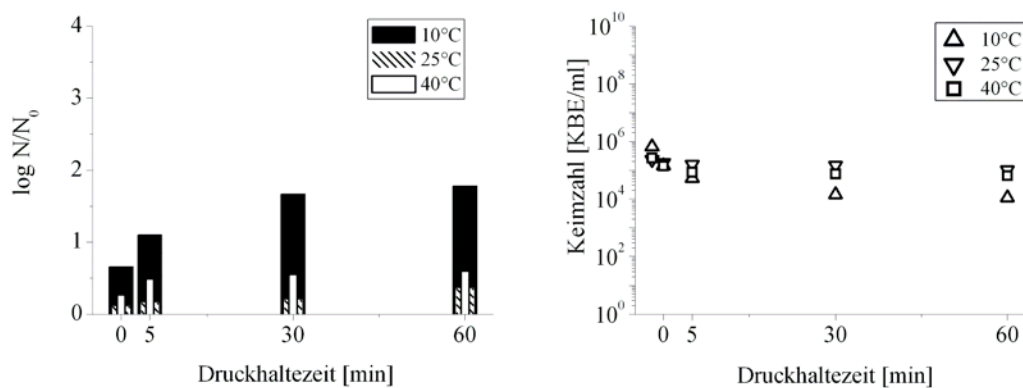


Abb. 56: Temperaturabhängige Keimzahlreduktion bei *A. niger* Kulturen (3 h vorgekeimte Sporensuspension); Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang)

Die Steigerung der Effektivität des Verfahrens bei höheren Temperaturen liegt vermutlich an der verbesserten Diffusion des Gases in die Zellen, welche bei Pilzen im Gegensatz zu den Bakterien durchaus zum bestimmenden Faktor werden kann. Die bereits nach 5 min erreichte maximale Keimzahlreduktion bestätigt dies. Bei geringerer Prozesstemperatur wird wie bereits für *B. atrophaeus* beschrieben, eine Verringerung der elastischen Verformbarkeit der Zellwand angenommen, was vermutlich beim Entspannungsprozess den Zerstörungseffekt des freigesetzten Gases vergrößert.

4.3.1.4 EINFLUSS DER AUSGANGSKEIMZAHL

In weiteren Versuchen sollte eine mögliche Abhängigkeit zwischen der Ausgangskeimzahl und dem Reduktionserfolg untersucht werden. Damit der Einfluss des Zellalters die Interpretation der Ergebnisse nicht erschwert, kamen Kulturen von Surrogatorganismen gleichen Alters, jedoch unterschiedlicher Konzentration zum Einsatz.

Bei den eingesetzten *B. atrophaeus* Kulturen war ein deutlicher Unterschied im Absterbeverhalten zwischen den verschiedenen Keimkonzentrationen zu erkennen. Mit der unverdünnten Probe konnte eine Reduktion um mehr als 99 % erzielt werden, während die

verdünnte Probe nur um ca. 50 % in ihrer Keimzahl reduziert wurde (Abb. 57). Da alle äußeren Bedingungen für beide Versuche identisch waren, muss der Grund für das unterschiedliche Absterbeverhalten in der Aufbereitung der Proben liegen: die Probe mit der geringen Zellzahl ist durch Verdünnung mit frischem Nährmedium hergestellt worden, während die Probe mit hoher Zelldichte direkt nach der Anzucht ohne weiteren Austausch an Nährmedium dem Druckwechselverfahren unterworfen wurde. Es ist daher nicht auszuschließen, dass bei der unverdünnten Probe die in höherer Konzentration vorliegenden Stoffwechselprodukte während der Druckhaltezeit oder beim Entspannungsvorgang zu toxischen Effekten an den Bakterienzellen führen.

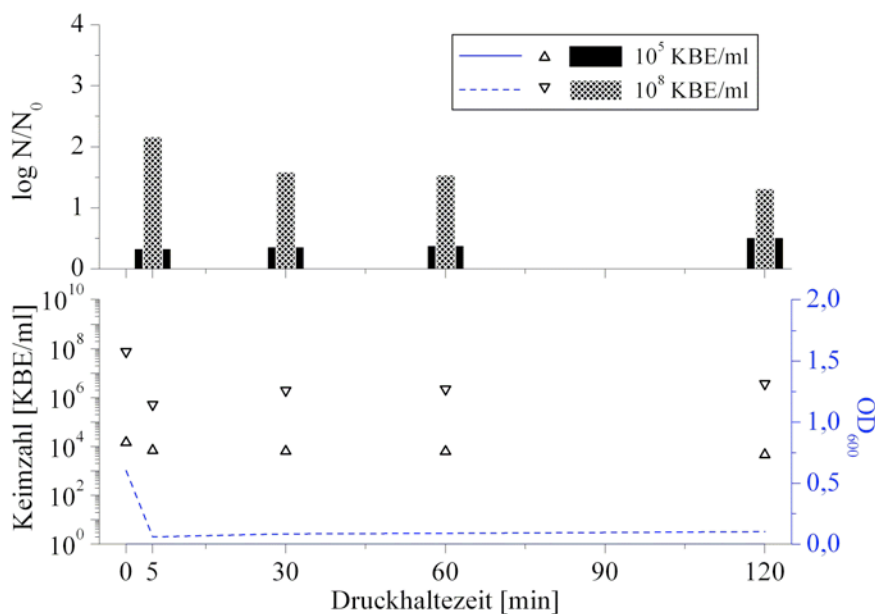


Abb. 57: Keimzahlreduktion verschiedener *B. atropheus* Kulturen in Abhängigkeit von der Zelldichte; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang)

Im Gegensatz zu den mit *B. atropheus* erhaltenen Ergebnissen war die Keimzahlreduktion bei *B. diminuta* nicht von der Ausgangskeimzahl abhängig. Bei beiden Proben konnte durch den Druckwechselprozess die Lebendkeimzahl um ca. 90 % reduziert werden (Abb. 58). Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen sich derzeit noch nicht interpretieren. Es wäre zu erwarten gewesen, dass unabhängig von der Ausgangskeimzahl bei identischen äußeren Bedingungen derselbe Prozentsatz an Mikroorganismen zerstört wird.

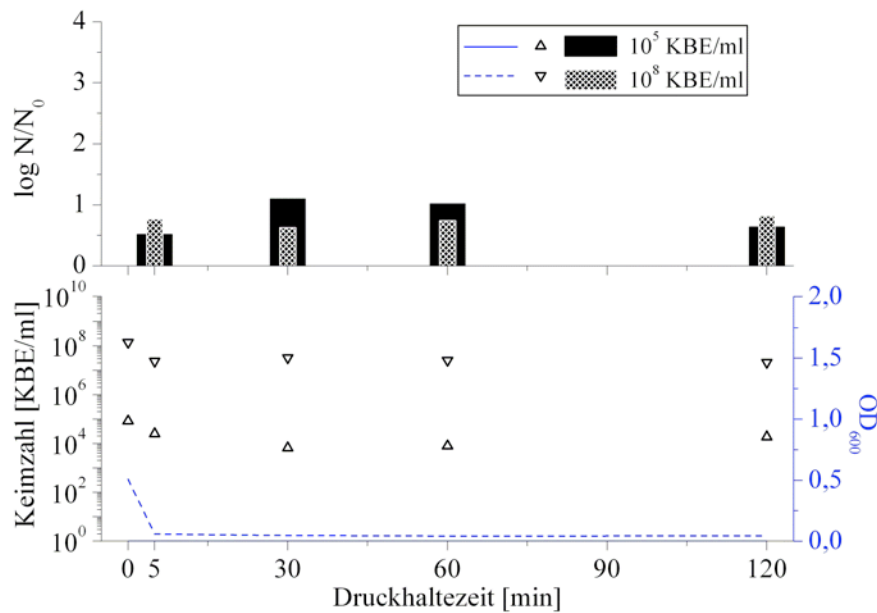


Abb. 58: Keimzahlreduktion verschiedener *B. diminuta* Kulturen in Abhängigkeit von der Zelldichte; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang; siehe Anhang)

4.3.1.5 EINFLUSS DES ZELLALTERS

Da bei den Diffusions- und Entspannungsprozessen der Aufbau der Zellwand eine entscheidende Rolle spielt, wird vermutet, dass das Alter der Zellen, einhergehend mit einer Veränderung der Zellwand, z.B. durch vorangegangene Zellteilungen, ebenfalls einen Einfluss auf das Reduktionsergebnis hat. Von Fraser durchgeführte Druckwechselversuche mit 24 h alten *E. coli* Kulturen (stationäre Wachstumsphase) bestätigen dies [120]. Die Reduktion der Lebendzellzahl war gegenüber den sich im exponentiellen Wachstum befindlichen Kulturen deutlich vermindert. Inwieweit diese Ergebnisse auf die Prozessbedingungen – N₂, 25°C und 500 bar – übertragbar sind, wurde an Zellkulturen unterschiedlichen Alters untersucht.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen an *B. atropheus* und *B. diminuta* Kulturen verschiedenen Alters wiesen dieselbe Tendenz auf. Sehr junge und sehr alte Zellen waren weniger gut mit der Druckwechseltechnologie zu erfassen (Abb. 59 und 60). Die schlechten Reduktionsergebnisse bei den jungen Zellen lassen einen Einfluss der Zellgröße und dem damit verbundenen A/V-Verhältnis auf den Behandlungserfolg vermuten. Bei alten Zellen könnte durch Narbenbildung, als Folge vieler Zellteilungen, eine Verdickung und/oder Verdichtung und damit eine Stabilisierung der Zellmembranen erfolgt sein. Dies belegen auch bereits publizierte AFM-Messungen [26].

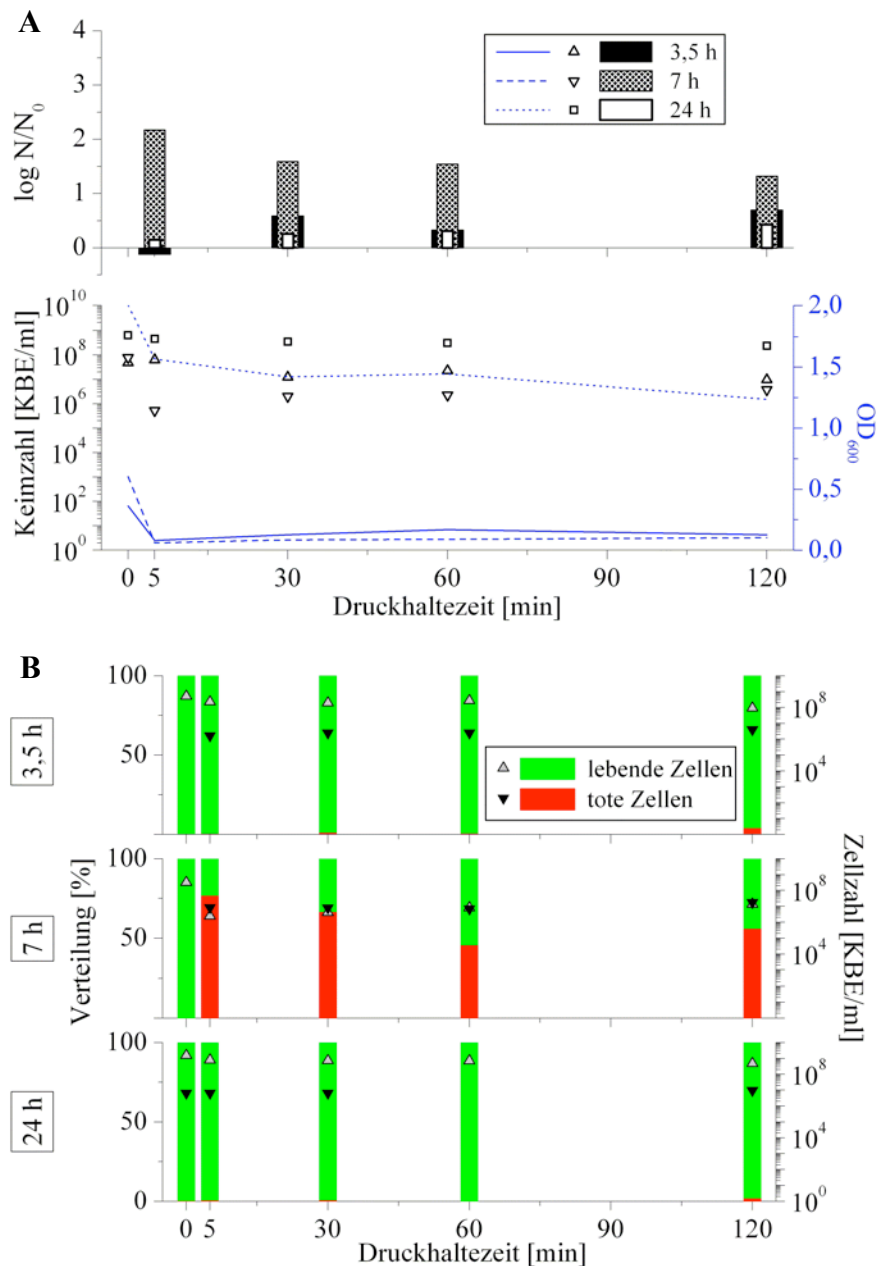


Abb. 59: Keimzahlreduktion verschiedener *B. atrophaeus* Kulturen in Abhängigkeit von deren Alter; Prozessgas: N_2 ; Druck 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsprozess; siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplassenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

Eine generelle Veränderung der elastischen Eigenschaften von Zellwänden durch das Zellalter konnte anhand von AFM-Messungen an Zellen aus der exponentiellen und aus der stationären Wachstumsphase nicht bestätigt werden [79, 80]. Neben der Veränderung der Zellwandeigenschaften ist bei *B. atrophaeus* auch eine einsetzende Sporulation als Überlebensstrategie denkbar. Aus den Wachstumsversuchen ist bekannt, dass unter den gegebenen Anzuchtbedingungen der Übergang aus dem exponentiellen Wachstum in das stationäre Wachstum nach 8-12 h Inkubation erfolgt. Die verwendeten „alten“ Zellen wurden für insgesamt 24 h inkubiert. Somit ist einerseits der Schlüsselreiz „Nährstoff-

mangel“ bzw. „zu hohe Konzentration an Stoffwechselprodukten“ und die für die Sporulation notwendige Zeit vorhanden. Die mikroskopische Auswertung der Live/Dead-Färbung ergab bei den *B. atropeus* Versuchen weder für junge noch für alte Zellen einen nennenswerten toxischen Einfluss der Prozessbedingungen. In beiden Fällen war lediglich nach einer Druckhaltezeit von 120 min ein Anteil < 5 % an toten Zellen zu verzeichnen. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Auswertung der *B. diminuta* Versuche gemacht werden (Abb. 60). Hier waren, wenn auch in geringerem Ausmaß, besonders bei den Zellen mittleren Alters, toxische Einflüsse des Verfahrens erkennbar.

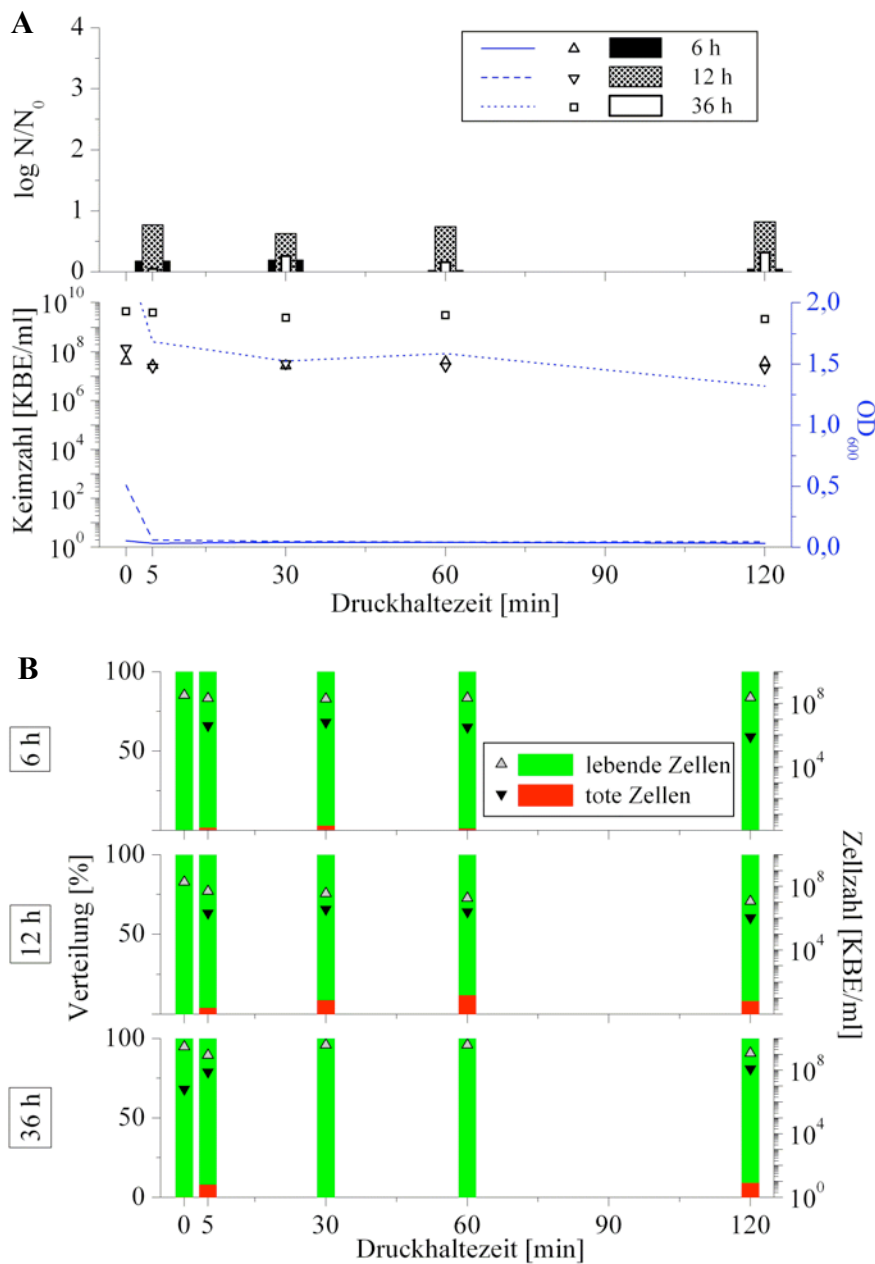


Abb. 60: Keimzahlreduktion verschiedener *B. diminuta* Kulturen in Abhängigkeit von deren Alter; Prozessgas: N₂; Druck 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang; siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

4.3.1.6 EINFLUSS DER DRUCKHALTEZEIT

Zur Absicherung der Aussage, dass der Gaseintrag in die Zellen innerhalb kurzer Zeit (< 5 min) annähernd vollständig erfolgt und somit das gesamte Zerstörungspotential des eingebrachten Stickstoffs bereits nach dieser Zeit gegeben ist, wurden Langzeitversuche durchgeführt. Dazu wurden Proben von *B. atrophaeus* und *B. diminuta* für eine Dauer von 12 h bei 500 bar Stickstoff druckwechselautoklaviert (Abb. 61).

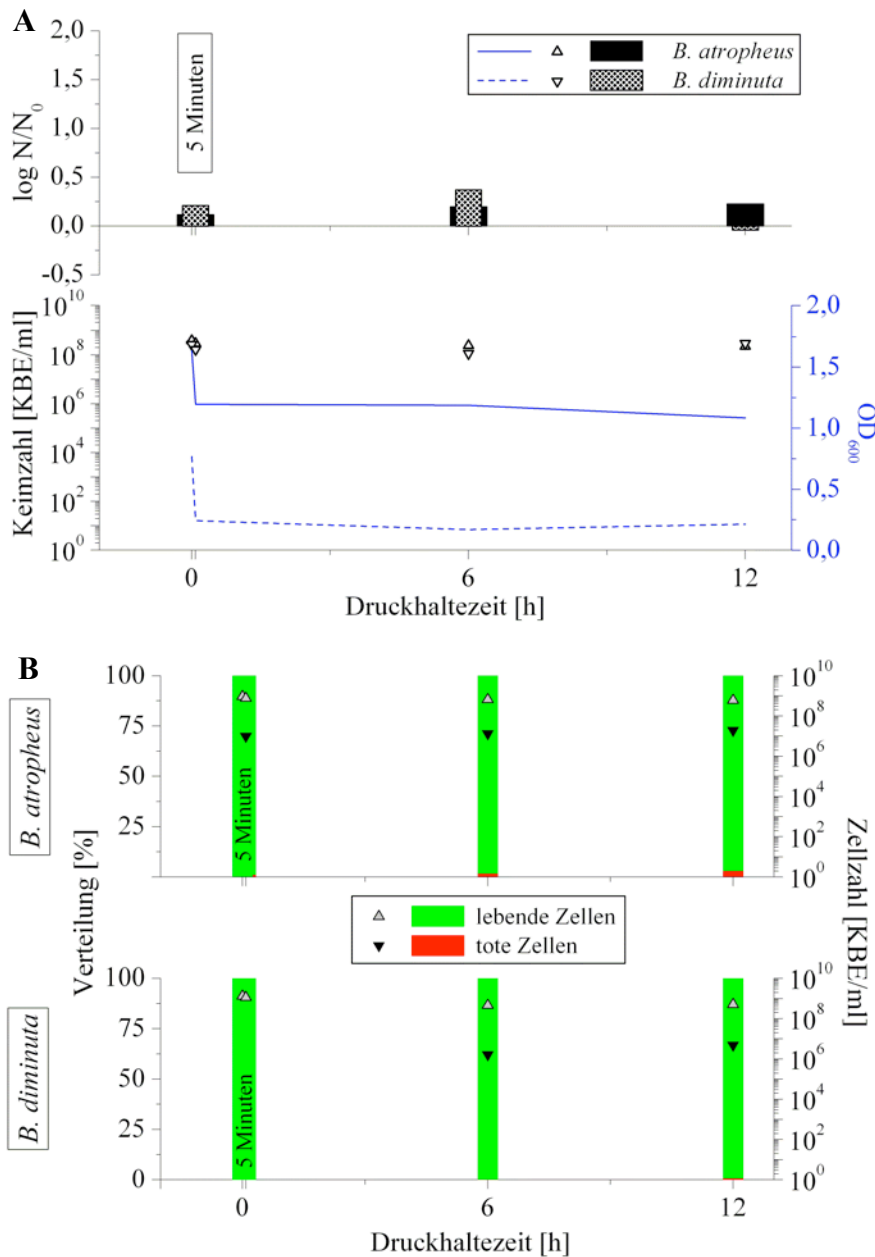


Abb. 61: Keimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Druckhaltezeit; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Diagramm A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatellplattenverfahrens und der optischen Dichte; Diagramm B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

Die Probenahmen erfolgten direkt nach der Druckbeaufschlagung sowie nach 6 und 12 h Druckhaltezeit. Die direkt nach der Druckbeaufschlagung erhaltene Keimzahlreduktions-

rate konnte durch die 6-stündige Behandlung nur minimal erhöht werden. Nach 12 h konnte bei der *B. atrophaeus* Kultur keine weitere Erhöhung der Reduktionsrate erzielt werden. Die *B. diminuta* Kultur wies sogar ein leichtes Wachstum auf (Abb. 61). Diese Ergebnisse belegen, dass eine verlängerte Druckhaltezeit und damit verbunden eine längere Zeit zur Einstellung des Gelöstgas-Gleichgewichts keine deutliche Verbesserung der Keimzahlreduktion bewirkt, woraus abgeleitet werden kann, dass die Gleichgewichtseinstellung bereits in den ersten Minuten nahezu abgeschlossen ist.

Parallel zu den Wachstumsversuchen wurden die zu den genannten Zeitpunkten entnommenen Proben mittels Live/Dead-Färbung auf tote, nicht zerplatzte Zellen untersucht. Dadurch sollte geklärt werden, ob ein stressbedingtes Absterben der Kulturen unter längerer Druckeinwirkung, wie es vielfach für die Hochdruckbehandlung mit hydrostatischem Druck beschrieben ist [163-165], ausgeschlossen werden kann. Die in Abb. 61 B dargestellten Ergebnisse belegen, dass über die Abtötung der Zellen durch Zerplatzen hinaus keine weiteren Effekte für die erreichte Keimzahlreduktion verantwortlich sind.

4.3.1.7 EINFLUSS DES ENTSPANNUNGSVOLUMENS UND DER ENTSPANNUNGS- HÄUFIGKEIT

Das Entspannungsvolumen der bisher beschriebenen Versuche lag im Bereich von 40 bis 70 ml. Da es in Abhängigkeit vom Entspannungsvolumen zu einem mehr oder weniger starken Druckabfall im System kam, war es notwendig, den Einfluss des Entspannungsvolumens auf die Keimzahlreduktion zu untersuchen. Um möglichst eindeutige Aussagen zu erhalten, wurde bei jeder Probenahme das gesamte Volumen (500 ml) entspannt. Zudem wurde in diesem Zusammenhang die Möglichkeit geprüft, ob sich bei einer Wiederholung des Druckwechselzyklus (Reprocessing) gleiche Reduktionsraten ergeben, oder ob mehrfach hintereinander stattfindende Entspannungen die Selektion besonders verfahrens-resistenter Keime begünstigen und diese in der Lage sind, ihre für die Resistenz relevanten Eigenschaften an nachfolgende Generationen zu übertragen. Zu diesem Zweck wurden 500 ml-Kulturen von *B. atrophaeus* und *B. diminuta* dreimal in Folge dem Druckwechselautoklaven zugeführt, mit 500 bar Stickstoff beaufschlagt und nach jeweils 30 min Druckhaltezeit komplett entspannt. Zu jedem Zeitpunkt (Beschickung und Entspannung) wurde die Lebendkeimzahl und die optische Dichte bestimmt sowie eine Live/Dead-Färbung durchgeführt. Um die Frage der Übertragbarkeit von Resistenzen auf nachfolgende Generationen zu klären, wurde ein Teil jeder dreifach druckwechselbehandelten Probe in frisches Nährmedium überführt, bis zum Erreichen einer Ausgangskeimzahl von

10^8 KBE/ml inkubiert und erneut dem Druckwechselprozess unterworfen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der 500 ml-Proben nach Komplettentspannung dargestellt (Abb. 62). Es ließ sich keine eindeutige Tendenz hinsichtlich der Entspannungshäufigkeit erkennen. Bei der *B. atropheus* Kultur war die 2. Entspannung (30-2) besonders effektiv, während die *B. diminuta* Kultur die stärkste Keimzahlreduktion bei der 3. Entspannung (30-3) aufwies. Insgesamt zeichnete sich ab, dass eine Mehrfachentspannung durchaus zu einer Verbesserung des Verfahrens führen kann.

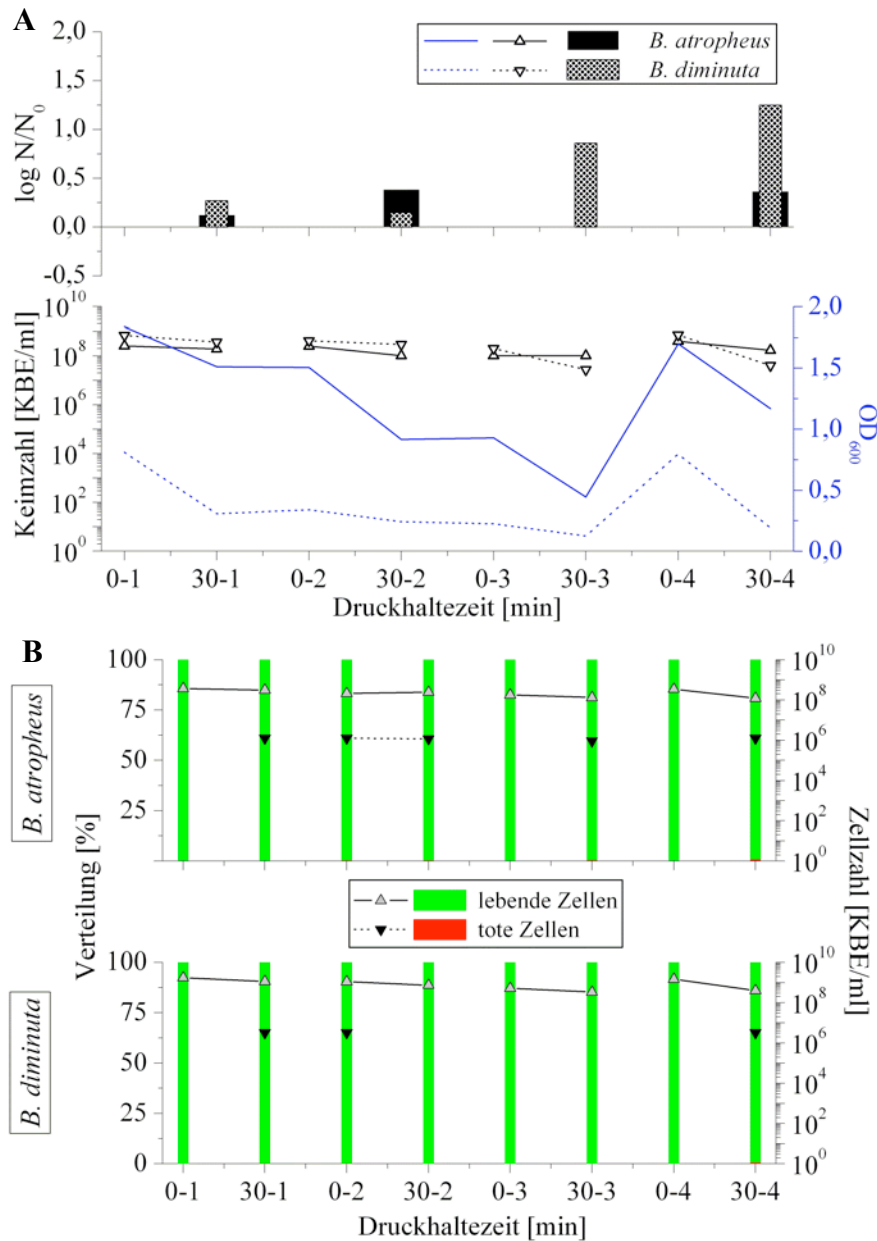


Abb. 62: Keimzahlreduktion nach mehreren Komplettentspannungszyklen; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang; siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

Eine Selektion besonders resistenter Mikroorganismen gegenüber dem Druckwechselverfahren ließ sich mit der nochmals frisch angezüchteten Probe nach der 3. Entspannung nicht nachweisen. Die betreffende *B. diminuta* Probe (30-4) wies vielmehr die höchste Keimreduktionsrate aller vier Entspannungen auf und die *B. atropheus* Probe (30-4) erzielte zumindest den höchsten Wert der am Vortag bestimmten Keimreduktionsraten. Verglichen mit den Ergebnissen aus den Teilentspannungsversuchen (Kap. 4.3.1.1.1 u. 4.3.1.1.2) ist für beide Spezies eine verminderte Reduktion bei fast allen Kompletterspannungen festzustellen. Erklärbar ist dies mit einer Verminderung der Druckdifferenz bei zunehmender Entspannungsdauer durch den mit der Entspannung verbundenen Druckabfall im Autoklav.

Während sich die Reduktionsraten für *B. diminuta* mit fortschreitender Entspannungshäufigkeit denen der teilentspannten Proben annäherten bzw. diese sogar überstiegen, lagen die mit *B. atropheus* erreichten Ergebnisse immer unterhalb der durch Teilentspannung erhaltenen Proben. Der Vergleich der Ergebnisse nach Live/Dead-Färbung ergab für die teilentspannte Probe nach 30 min Druckhaltezeit einen wesentlich höheren Anteil toter Zellen (*B. atropheus* ca. 60 %; *B. diminuta* ca. 10 %). Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass es in der Initialphase der Entspannung neben dem Zerplatzen der Zellen auch zu einer tödlichen, jedoch nicht zerstörerischen Schädigung der Zellen kommt. Das bei der Kompletterspannung ca. 8-fach größere freigesetzte Volumen führt dann zu einer starken Verdünnung dieser toten, aber äußerlich intakten Keime, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Detektion durch die Live/Dead-Färbung gering ist.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlußfolgern, dass mehrere aufeinander folgende Entspannungszyklen die Gesamtreduktionsrate positiv beeinflussen und dass zur Erzielung gleicher Entspannungsvolumina eine Abfolge mehrerer Teilentspannungen der Kompletterspannung vorzuziehen ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits publizierten Prozessabfolgen bei der Entkeimung mit überkritischem Kohlendioxid [98].

4.3.1.8 MODIFIZIERUNG DER FLUIDITÄT VON ZELLMEMBRANEN AN AUSGEWÄHLTEN MIKROORGANISMEN

Einen fluidisierenden bzw. rigidisierenden Effekt auf die Struktur der Zellmembranen der Mikroorganismen herbeizuführen, um somit den vermuteten Temperatureinfluss auf die Zellmembranen (Veränderung der Fluidität) zu modellieren und dadurch zu bestätigen, war das Ziel weiterer Untersuchungen. Zur Erreichung des fluidisierenden Effektes wurden 20 % (V/V) des penetrationsbeschleunigend wirkenden Dimethylsulfoxid (DMSO) der Keimsuspension zugesetzt. Als rigidisierend wirkendes Agens kam das als nachweislich

penetrationshemmende wirkende Natriumlactat in einer Konzentration von 10 % (V/V) zum Einsatz. Beide eingesetzte Substanzen hatten bei den Kulturen von *B. atrophaeus* einen protektiven Einfluss auf die Mikroorganismenzellen (Abb. 63).

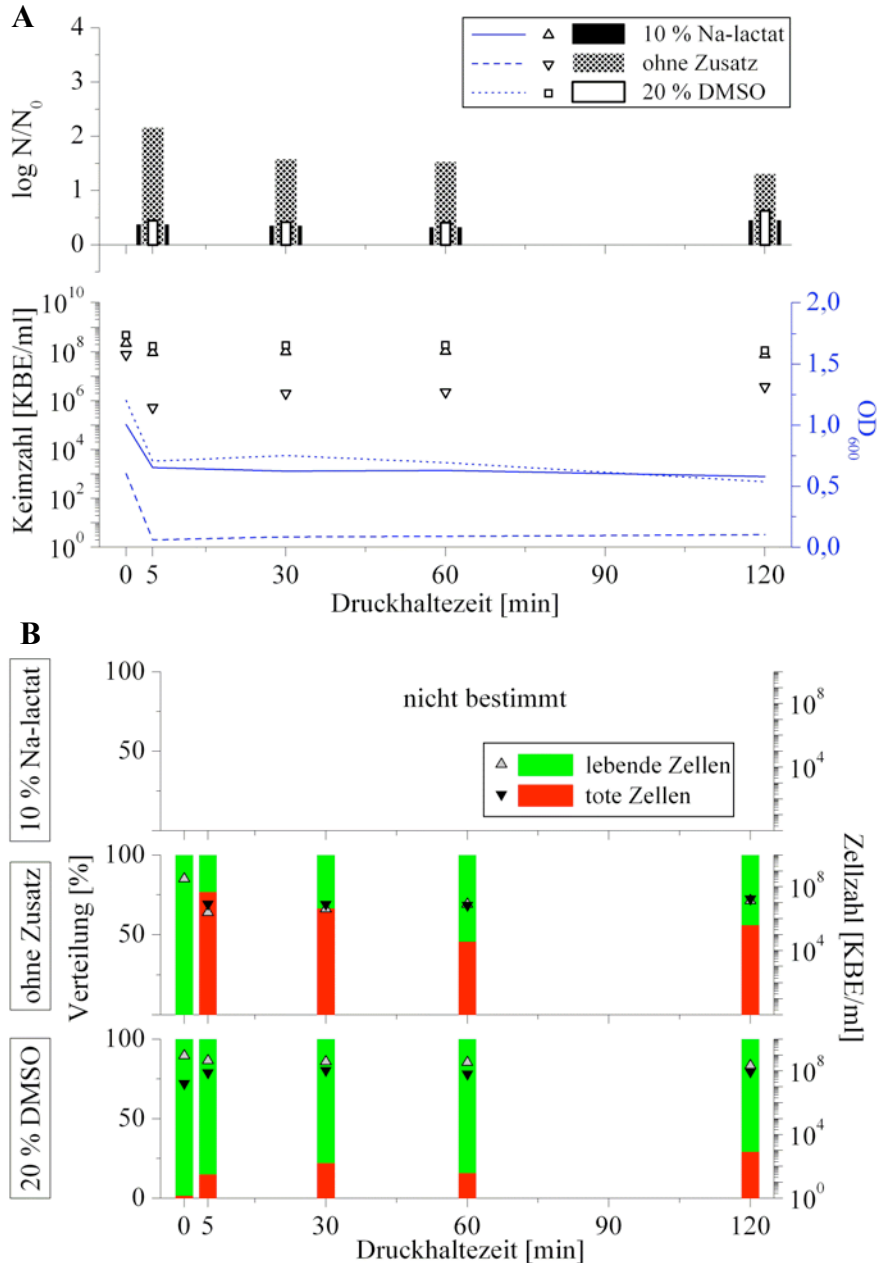


Abb. 63: Beeinflussung der Keimzahlreduktion von *B. atrophaeus* durch Zusatz eines Penetrationsverzögerers (Na-lactat) bzw. -beschleunigers (DMSO); Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

Von DMSO ist bekannt, dass es durch seinen amphiphilen Charakter sehr leicht in Biomembranen diffundieren kann und dort einerseits die Fluidität der Phospholipiddoppelschicht erhöht und andererseits eine Abnahme der Membrandicke bewirkt [166]. Letzteres ist durch eine Interaktion mit den polaren Kopfgruppen, den

hydrophoben Lipidresten und einer damit einhergehenden Verringerung des Ordnungsgrades bzw. Molekülabstandes zu erklären. Bei DMSO-Konzentrationen > 10 mol % kommt es zusätzlich zur Ausbildung von vorübergehenden Wasserporen und ab einer Konzentration > 25 mol % zu einer Zerstörung der Lipiddoppelschicht. Bei der verwendeten Konzentration von 20 % (V/V), die einer molaren Konzentration von 5,4 % entspricht, sind daher nur die erst genannten Effekte zu erwarten. Diese Fluidisierung, wie sie auch bei einer Temperaturerhöhung zu erwarten ist, führt zu einer erhöhten Elastizität der Zellmembran und dadurch zu einer Verringerung des Schädigungspotentials des expandierenden Gases während der Entspannung. Auch ist ein beschleunigter Gasaustausch und damit verbunden ein schnellerer Druckausgleich denkbar. Die Ergebnisse der Druckwechselbehandlung von *B. atrophaeus* und *B. diminuta* unter Einfluss von DMSO bestätigen dies (Abb. 63 und 64). Der bei *B. atrophaeus* vorhandene, gering ausgeprägte Reduktionserfolg konnte durch die Auswertung der Live/Dead-Färbung auf toxische Effekte zurückgeführt werden. Die vergleichbaren *B. diminuta* Proben wiesen keine durch toxische Effekte abgetöteten Zellen auf; auch konnte insgesamt keine Zellreduktion festgestellt werden.

Der Zusatz von Natriumlactat als rigidisierendes Agens führte bei *B. atrophaeus* wie DMSO zu einer deutlichen Verringerung der Reduktionsrate. Die *B. diminuta* Proben wiesen hingegen eine leicht erhöhte Reduktionsrate auf. Beide Ergebnisse sind mit einer Verfestigung der Zellmembran zu erklären, weil eine Verfestigung einerseits die mechanische Stabilität erhöhen, andererseits aber auch die Bruchdehnung verringern kann. Die trotz erhöhter Reduktionsrate geringe Zahl an toten, nicht zerstörten Zellen ist ein Hinweis darauf.

Ein Einfluss der Membranfluidität auf den Druckwechselerfolg ist damit eindeutig belegt. Bei der praktischen Anwendung des Druckwechselverfahrens sollte daher auch immer der Einfluss der verwendeten Hilfstoffe in den zu entkeimenden Zubereitungen berücksichtigt werden.

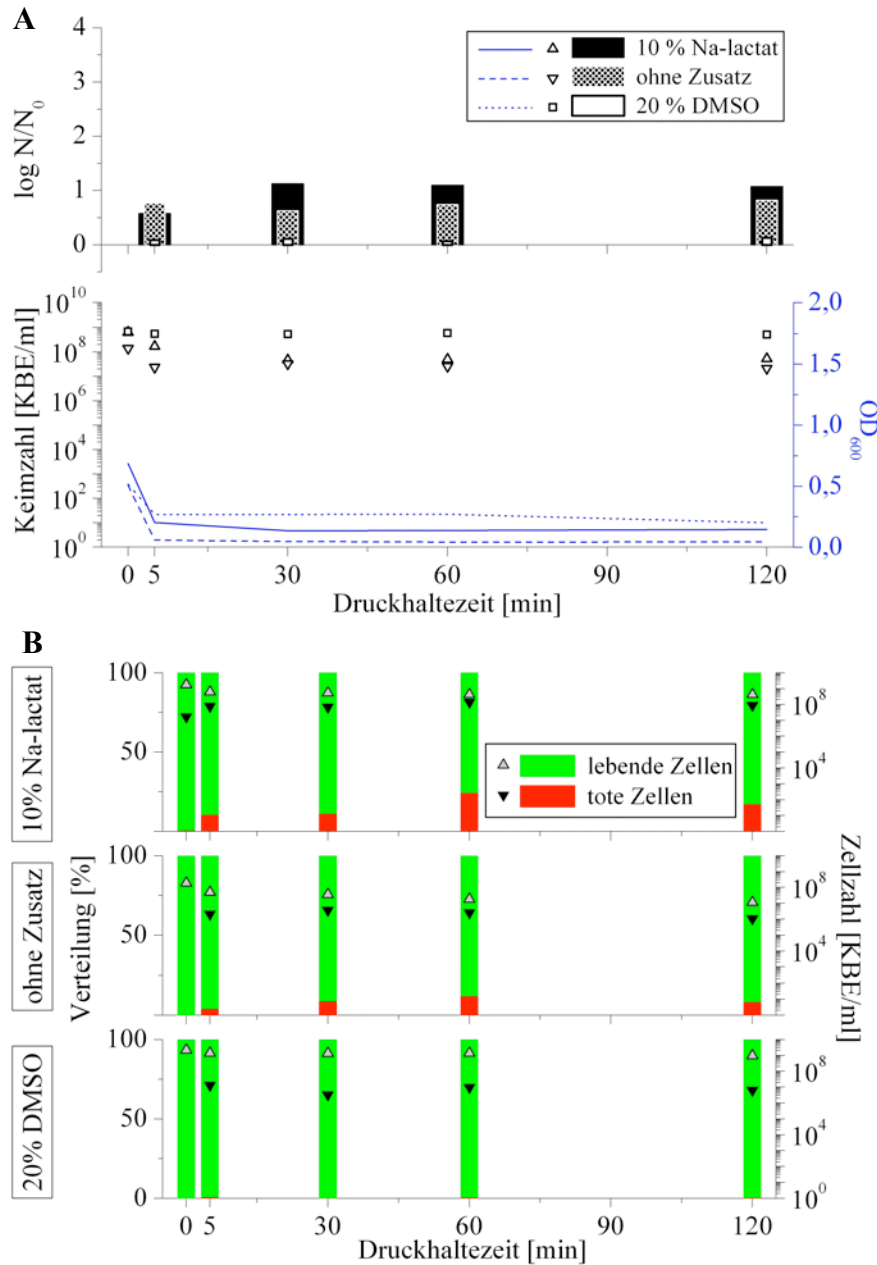


Abb. 64: Beeinflussung der Keimzahlreduktion von *B. diminuta* durch Zusatz eines Penetrationsverzögerers (Na-lactat) bzw. -beschleunigers (DMSO); Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

4.3.1.9 EINFLUSS DES EINGESETZTEN PROBEVOLUMENS

Das eingesetzte Probenvolumen hat einen deutlichen Einfluss auf den Druckabfall im System während des Entspannungsvorgangs. Je kleiner das Volumen der Probe, d.h. je größer das Volumen des Gasraumes, desto geringer ist der Druckabfall im System bei gleicher Probenahmemenge. Zur Quantifizierung dieses Einflusses kamen Volumina von 125, 250 und 500 ml zum Einsatz. Bei den 125 ml- und 250 ml-Proben war es aufgrund der zu geringen Gesamtvolumina nicht möglich, die letzte Probe nach 120 min zu entnehmen (Abb. 65 und 66).

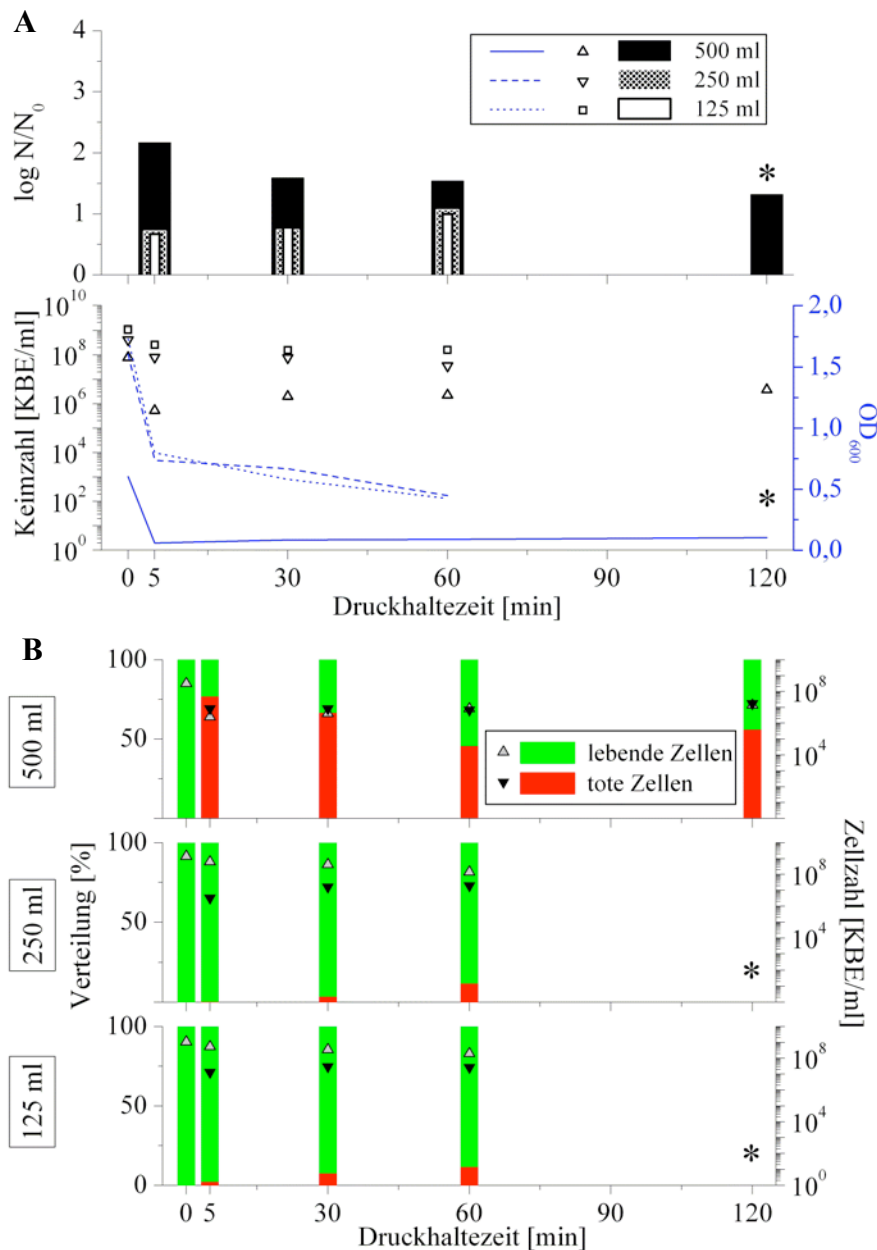


Abb. 65: Beeinflussung der Keimzahlreduktion von *B. atropheus* durch Variation des eingesetzten Volumens; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung; *Aufgrund des zu geringen Restvolumens war keine Probenahme möglich

Die mit *B. atropheus* Kulturen erhaltenen Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen; ein geringeres Volumen im System hätte sich positiv auf den Reduktionserfolg auswirken sollen (Abb. 65). Die höchste Keimzahlreduktion konnte bei der 500 ml-Probe erzielt werden, obwohl der Druckabfall im System während der Entspannung hier mit durchschnittlich 59 bar am größten war. Die Live/Dead-Färbung ergab überraschender Weise nur bei den 500 ml-Proben einen deutlich erhöhten Anteil an toten, nicht zerstörten Zellen. Vernachlässigt man jedoch die durch die toxischen Effekte inaktivierten Zellen bei der Bestimmung der Reduktionsrate ist kein volumenabhängiger Unterschied zu erkennen.

Der unterschiedlich stark ausgeprägte Druckabfall im System hat somit keinen Einfluss auf den Reduktionserfolg. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei den *B. diminuta* Versuchen. Auch hier war kein Einfluss der eingesetzten Probemenge auf die Keimzahlreduktion zu erkennen (Abb. 66).

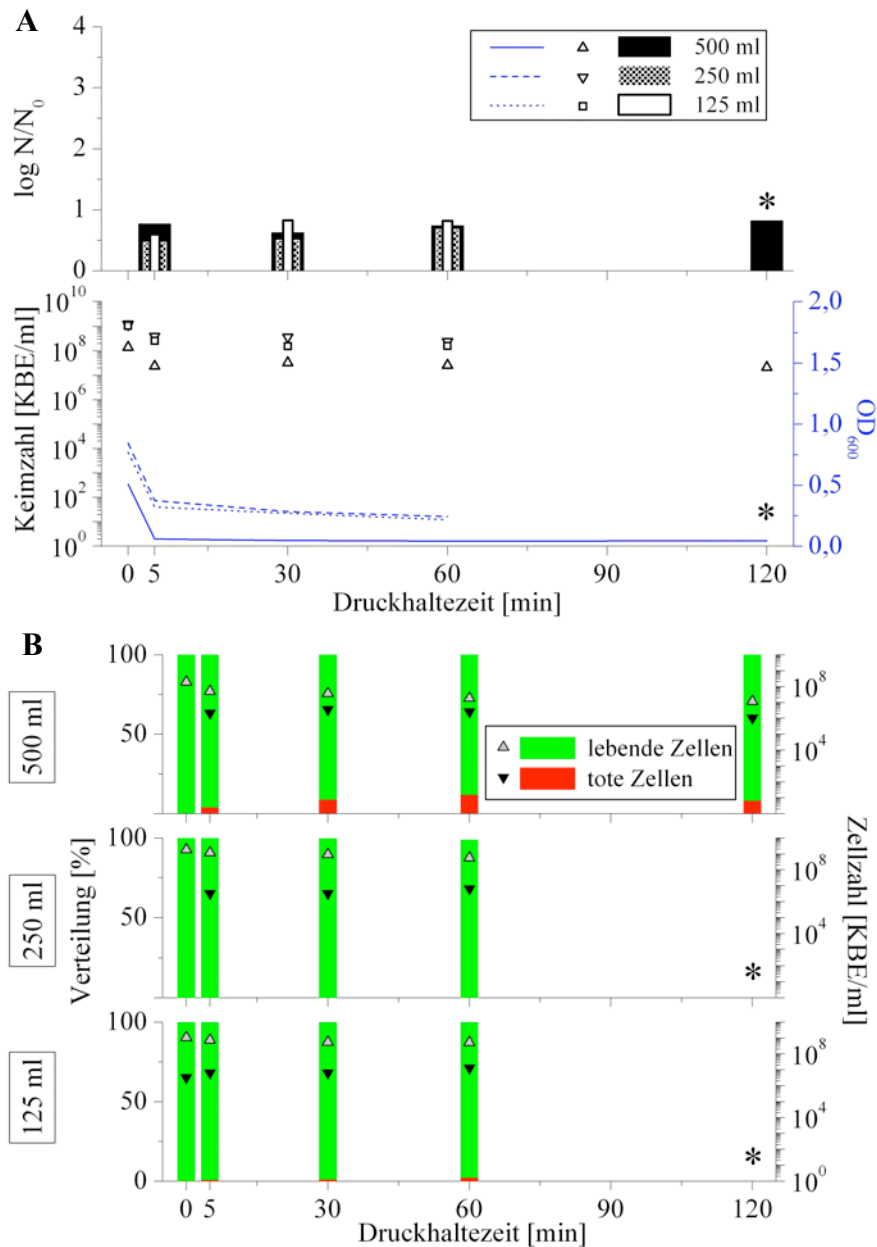


Abb. 66: Beeinflussung der Keimzahlreduktion von *B. diminuta* durch Variation des eingesetzten Volumens; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatellplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung; * aufgrund des zu geringen Restvolumens war keine Probenahme möglich

4.3.1.10 EINFLUSS DER VISKOSITÄT DES MEDIUMS

Die Viskosität des Mediums kann einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung des Druckwechselverfahrens nehmen. Zum einen ist eine verlangsamte Gasdiffusion bei steigender Viskosität zu erwarten und damit eine verzögert einsetzende Keimzahlreduktion.

Zum anderen liegt eine verminderte Keimzahlreduktion bei erhöhter Viskosität nahe, da diese die Scherbeanspruchung der Zellen während der Entspannung vermindert. Für idealviskose Systeme ergibt das Produkt aus dynamischer Viskosität η und Schergeschwindigkeit D nach Newton die Scherkraft τ (Gl. 11).

$$\tau = \eta * D \quad \text{[Gl. 11]}$$

Aus konstanter Scherkraft und erhöhter Viskosität des Mediums resultiert eine reduzierte Schergeschwindigkeit. Inwiefern Scherprozesse und/oder eine veränderte Gasdiffusion einen Einfluss auf die zeitabhängige Effektivität des Druckwechselverfahrens haben, wurde an Medien unterschiedlicher Viskosität untersucht. Diese wurden jeweils durch Animpfen mit einer Vorkultur auf eine Ausgangskeimzahl von ca. 10^5 KBE/ml eingestellt. Als niederviskose Medien kamen isotone Kochsalzlösung sowie CASO-Nährbouillon zum Einsatz (Tab. 14).

Tab. 14: Dynamische Viskosität der eingesetzten Medien ($\bar{x} \pm s$, * n=3, ** n=6)

	η [mPa*s]	Temp. [°C]	Methode
isotone NaCl-Lsg.	$1,005 \pm 0,001^*$	21,5	Ubbelohde
CASO-Bouillon	$1,067 \pm 0,001^*$	21,5	Ubbelohde
10 %iges Aerosil [®] -Gel	$95,841 \pm 13,207^{**}$	20,0	Kegel-Platte

Der Zusatz von 10 % (m/m) hochdisperssem Siliciumdioxid zu einer isotonen Kochsalzlösung führte zu einer deutlichen Erhöhung der Viskosität. Diese Zubereitung diente daher als Modell für ein Medium mit erhöhter Viskosität. Dabei war ein gegenläufiges Verhalten hinsichtlich der Viskosität und der Reduktionsrate zu erwarten. Die mit *B. atropheus* und *B. diminuta* erhaltenen Ergebnisse widerlegten dies jedoch (Abb. 67 und 68). Das Medium der höchsten Viskosität wies in den meisten Fällen die höchste Reduktionsrate auf, was jedoch auch auf die sauren Eigenschaften der kolloidalen Kieselsäure zurückgeführt werden könnte. Die enthaltenen Silanolgruppen deprotonieren im wässrigem Medium und führen so zu einer pH-Wert-Abnahme im System (ca. pH 4). Diese Azidifizierung kann, wie bereits als Wirkungsmechanismus für die Entkeimung mit Kohlendioxid diskutiert (siehe Kap. 3.3.2), zu einer Abtötung der Zellen führen. Dagegen spricht jedoch die konstante Reduktionsrate bei dem *B. atropheus* Versuch, welche bei den genannten Kohlendioxid-Versuchen nicht zu beobachten war [116, 167]. Vielmehr war eine deutlich ausgeprägte Zeitabhängigkeit zu erkennen. Es ist daher davon auszugehen, dass eine verminderte Diffusionsgeschwindigkeit den intrazellulären Druckabbau während der Entspannungsphase verlangsamt.

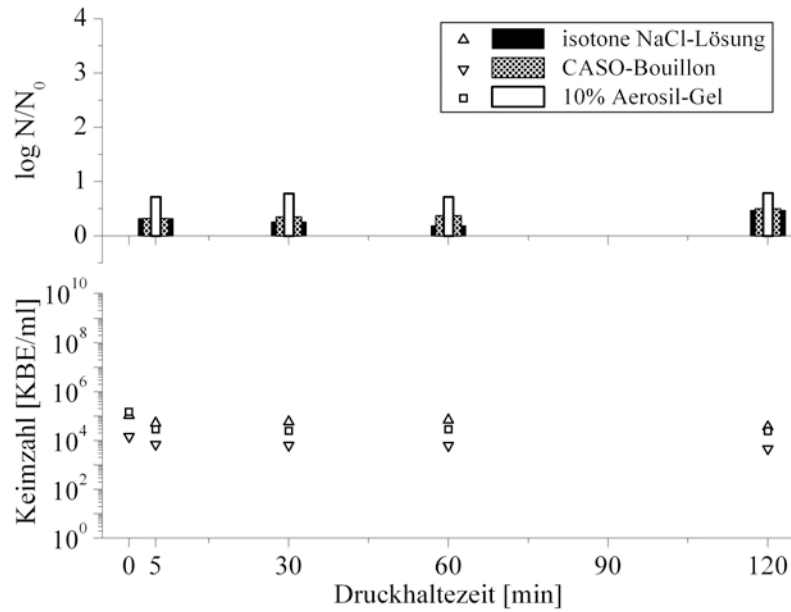


Abb. 67: Beeinflussung der Keimzahlreduktion von *B. atropheus* durch die Viskosität des Mediums; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte

Aufgrund der geringen Viskositätsunterschiede zwischen isotoner Kochsalzlösung und CASO-Nährbouillon waren erwartungsgemäß kaum Unterschiede in den Reduktionsraten zu erkennen. Im Gegensatz zu den *B. atropheus* Versuchen zeichnete sich bei der Druckwechselbehandlung der höherviskosen *B. diminuta* Suspension eine zeitabhängige Einflussnahme des Mediums ab (Abb. 68).

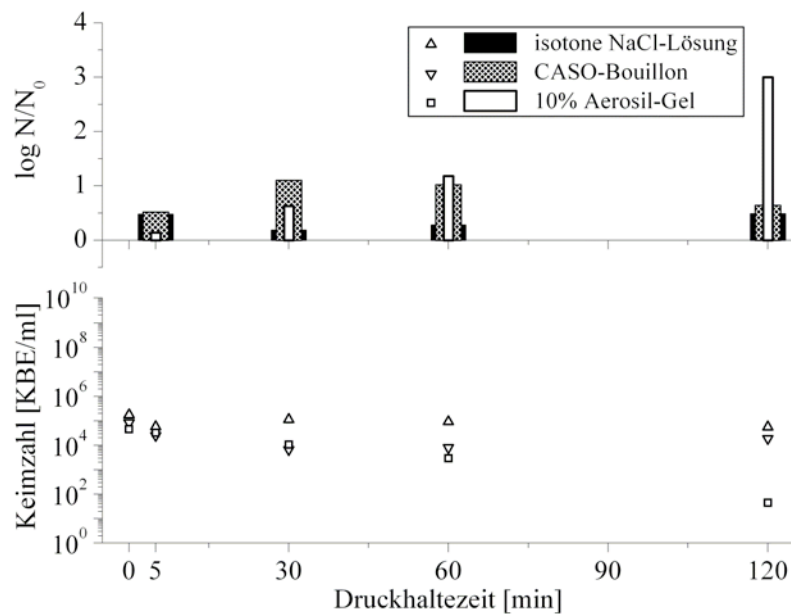


Abb. 68: Beeinflussung der Keimzahlreduktion von *B. diminuta* durch die Viskosität des Mediums; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte

Hier war eine Erhöhung der Reduktionsrate mit steigender Druckhaltezeit zu erkennen. Der lineare Anstieg der Reduktionsrate bei halblogarithmischer Auftragung weist auf eine dem Abtötungsprozess zugrundeliegende Reaktionskinetik 1. Ordnung hin. Der bereits diskutierte pH-Wert-Einfluss des Kieselsäure-Gels scheint sich hier deutlich in einer zeitabhängigen Erhöhung der Reduktionsrate zu manifestieren.

4.3.1.11 ZERSTÖRUNG INAKTIVIERTER MIKROORGANISMEN

Die Untersuchung des Einflusses einer Zellschädigung auf das Verhalten der Zelle im Druckwechselprozess war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit. Es wurde vermutet, dass eine nicht-tödliche Zellschädigung, in Form von kleinen Poren oder Rissen, einen schützenden Einfluss auf die Zellen im Entspannungsprozess ausübt, indem diese einen schnellen Gasaustritt ermöglichen ohne dass eine vollständige Zerstörung der Hülle eintritt. Zu diesem Zweck wurden Kulturen von *B. atrophaeus* und *B. diminuta* bis zum Erreichen einer Zelldichte von 10^8 KBE/ml unter den keimspezifischen Bedingungen inkubiert und im Anschluss durch Dampfsterilisation (121°C , 2 bar, 15 min) inaktiviert. Danach erfolgte eine Druckwechselbehandlung bei 500 bar mit Stickstoff als Prozessgas. Die quantitative Auswertung der Proben erfolgte ausschließlich durch Auszählung der mikroskopischen Bilder nach Live/Dead-Färbung. Dabei wiesen die inaktivierten Zellkulturen insgesamt eine geringere Zellreduktionsrate auf als druckwechselbehandelte Proben von lebenden Kulturen (Abb. 69).

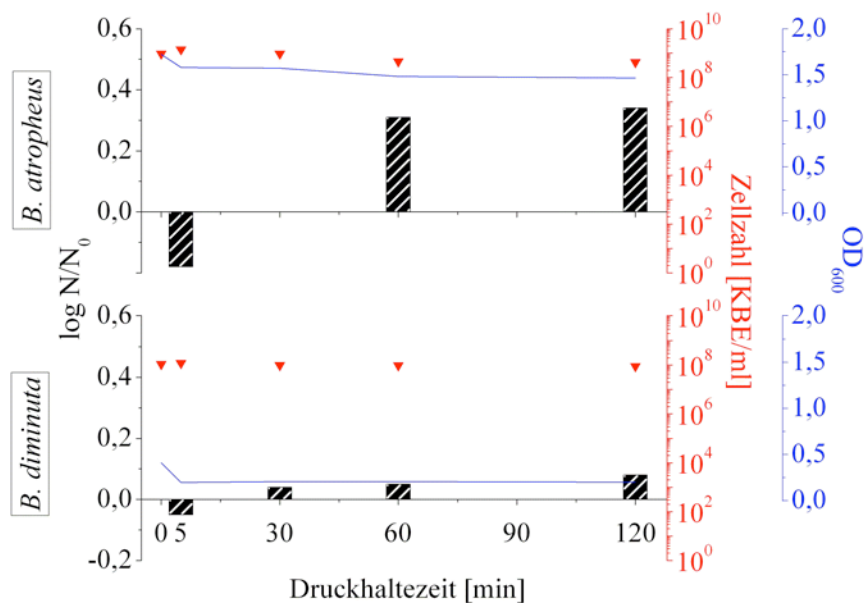


Abb. 69: Zerstörung von durch Dampfsterilisation inaktivierten Mikroorganismen mittels Druckwechselverfahren; Prozessgas: N_2 ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Darstellung der Zellzahlreduktion anhand der Live/Dead-Ergebnisse

Die geringe Abnahme der optischen Dichte ist ebenfalls ein Beleg dafür. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen im Phasenkontrast sowie nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht konnte belegt werden, dass die durch Dampfsterilisation inaktivierten Zellen äußerlich intakt waren und auch die anschließende Druckwechselbehandlung keine Zellreduktion durch Zerplatzen im für lebende Zellen üblichen Ausmaß bewirkte (Abb. 70).

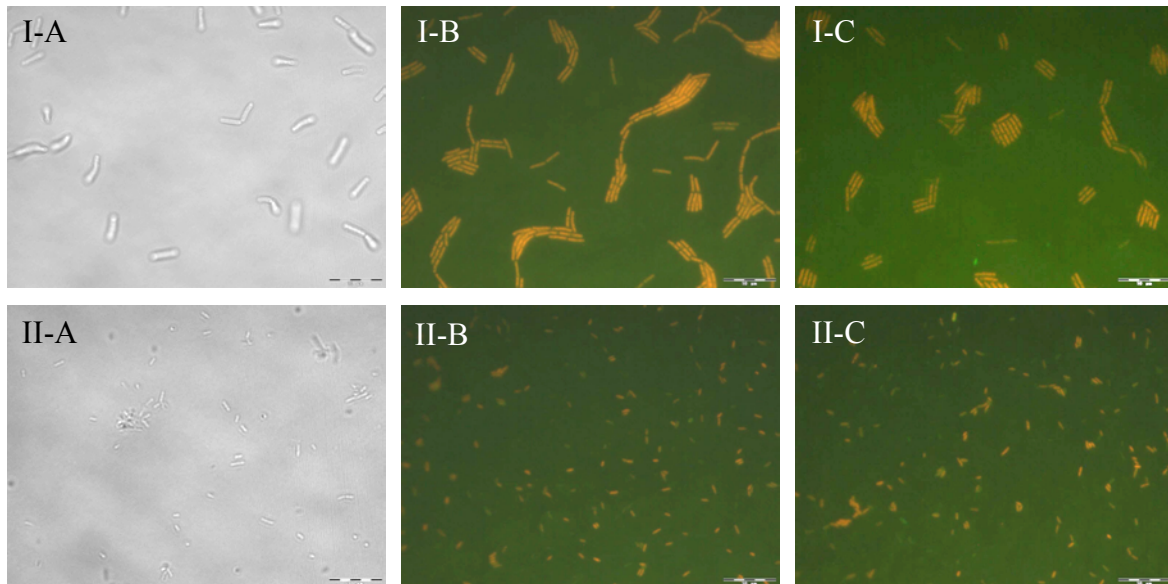


Abb. 70: Mikroskopische Darstellung der dampfsterilisierten und anschließend druckwechselbehandelten Zellen von *B. atrophaeus* (I) und *B. diminuta* (II) bei 1.000-facher Vergrößerung; A: Startprobe im Phasenkontrast; B: Startprobe nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht; C: 120 min-Probe nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht; Vergrößerung: 1.000-fach

Damit wurde nachgewiesen, dass tote, jedoch äußerlich intakte Zellen schlechter durch das Druckwechselverfahren erfasst werden, als lebende. Für den Druckwechsel an lebenden Zellen ist daher zu vermuten, dass eine leichte Zellschädigung, z.B. infolge des Druckverlustes im Autoklav während der Entspannung und dem damit verbundenen Ausgasungsprozess, einen durchaus positiven Einfluss auf das Überleben der Zellen nehmen kann. Auch eine geringfügige Schädigung während der Entspannung durch auftretende Scherkräfte ist als Schutz vor Zerplatzen denkbar.

4.3.2 PROZESSGAS DISTICKSTOFFOXID

Neben Stickstoff als Prozessgas wurden zahlreiche Versuche mit Distickstoffoxid (Lachgas) durchgeführt. Ein deutlicher Vorteil gegenüber Stickstoff liegt in der wesentlich besseren Wasserlöslichkeit des Distickstoffoxids und der damit verbundenen Möglichkeit, bei gleichem Druck höhere Gasmengen einzutragen. Zu berücksichtigen ist dabei jedoch, dass Distickstoffoxid aufgrund der Lage des kritischen Punktes bei 72,4 bar und 36,4°C im Druckwechselprozess druckverflüssigt werden kann (Tab. 15). Während der Druckhaltezeit

entsteht somit ein ternäres System aus flüssigem Sterilisationsgut, flüssigem Distickstoffoxid und einer mit beiden Phasen im Gleichgewicht stehenden Dampfphase. Dies hat den Vorteil, dass während des Entspannungsprozesses eine bessere Zerstäubung durch den spontanen Übergang des Distickstoffoxids vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand erzielt werden kann. Andererseits ist der Druckabfall im Autoklav während des Entspannungs Vorgangs verglichen mit dem Druckabfall bei den Stickstoffversuchen um den Faktor 2 bis 2,5 höher. Die gute Wasserlöslichkeit und die Druckverflüssigung stehen hier einem schnellen Übergang in die Gasphase und damit einer schnellen Kompensation des Druckverlustes entgegen.

Tab. 15: Physikalische Eigenschaften von Distickstoffoxid [153]

Molare Masse [g/mol]		44,01
Kritischer Punkt	Temperatur [K]	309,56
	Druck [bar]	72,40
Tripelpunkt	Temperatur [K]	182,34
	Druck [bar]	0,88
Siedepunkt (bei 1,013 bar) [K]		184,69
Ostwald'scher Löslichkeitskoeffizient (Wasser)	L _{10°C; 1,013 bar}	0,9140
	L _{25°C; 1,013 bar}	0,5937
	L _{40°C; 1,013 bar}	0,4190

Das Distickstoffoxidmolekül ist linear, mesomeriestabilisiert und isoelektronisch zu Kohlendioxid. Die Gewinnung der Reinform kann durch Erhitzen von konzentrierten wässrigen Ammoniumnitrat-Lösungen oder durch vorsichtiges Schmelzen von festem Ammoniumnitrat erfolgen [168]. Distickstoffmonoxid ist bei Raumtemperatur reaktionsträge, befindet sich jedoch nur in einem metastabilen Zustand und zerfällt bei höheren Temperaturen (> 600°C) in die einzelnen Elemente [169]. Die Löslichkeit von Distickstoffoxid in Wasser ist, ähnlich der von Stickstoff, stark temperaturabhängig. So verringert ein Temperaturanstieg von 10 auf 40°C die Löslichkeit um mehr als die Hälfte (Abb. 71). Darüber hinaus ist oberhalb des Verflüssigungsdruckes die druckabhängige Löslichkeitszunahme nur noch gering ausgeprägt.

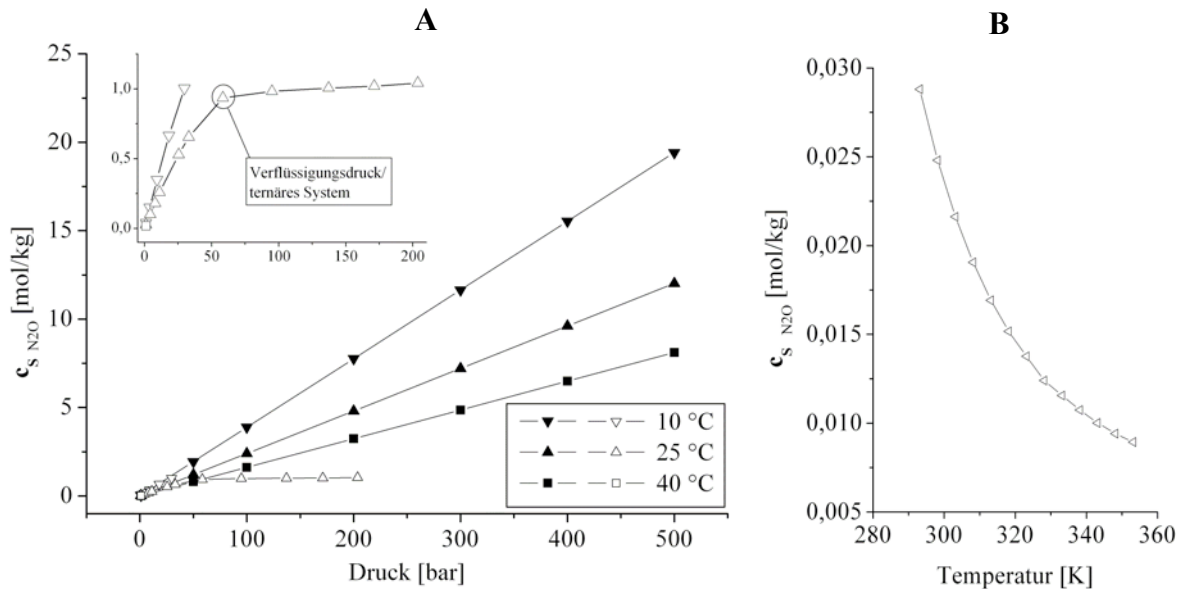


Abb. 71: Löslichkeit von Distickstoffoxid in Wasser in Abhängigkeit von Temperatur und Druck. Die ausgefüllten Symbole stellen die druckabhängige Löslichkeit berechnet nach dem Henry'schen Gesetz dar. Die leeren Symbole entsprechen der Literatur entnommenen Daten. A: Löslichkeit bei 10°C, 25°C und 40°C nach [170]; B: temperaturabhängige Löslichkeit bei 1 bar nach [145]

In Analogie zu den für Stickstoff getroffenen Annahmen ergeben sich aus der Löslichkeit des Distickstoffoxids bei 500 bar in Wasser die in Abb. 72 dargestellten zellulären Druck/Volumen-Verhältnisse während des Entspannungsvorgangs.

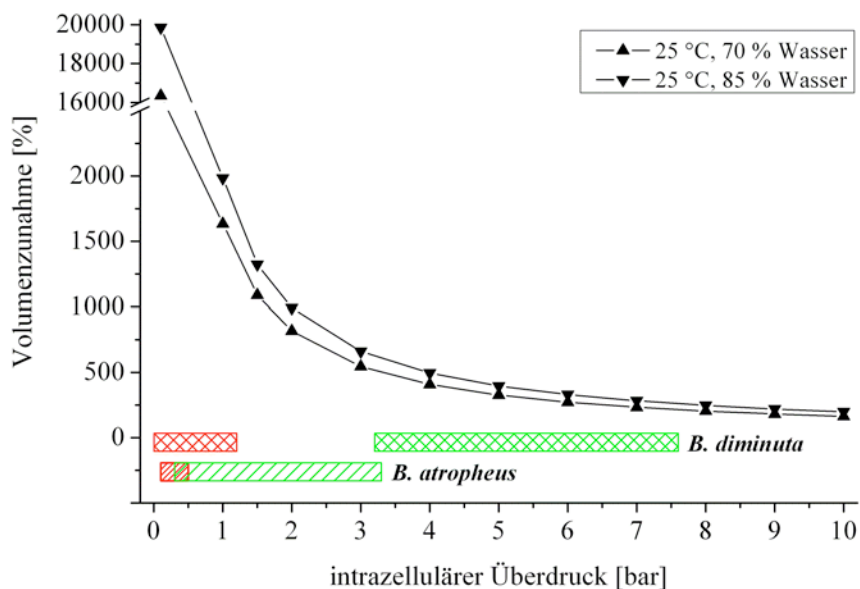


Abb. 72: Prozentuale Volumenzunahme in Abhängigkeit vom intrazellulären Überdruck bei Mikroorganismenzellen während der Entspannung von 500 bar auf Atmosphärendruck unter Verwendung von Distickstoffoxid als Prozessgas. Die farbigen Bereiche stellen die Ergebnisse der AFM-Messungen dar (Rot: Druckbereich der zerplatzen Zellen, Grün: tolerierte maximale Druckbelastung nicht zerplatter Zellen; vgl. Kap. 2.3.4).

Demnach verursacht die im Vergleich zu Stickstoff bei 500 bar 5-fach höhere Löslichkeit von Distickstoffoxid bei gleicher Volumenzunahme der Zellen einen 5-fach höheren intrazellulären Druck bzw. ist die für den gleichen intrazellulären Druck notwendige Volumenzunahme um den Faktor 5 größer. Dies lässt vermuten, dass die Keimzahlreduktion durch Zerplatzen unter Verwendung von Distickstoffoxid als Prozessgas deutlich stärker ausgeprägt sein muss als es bei den Stickstoffversuchen zu beobachten war. Ein weiterer Unterschied zum bisher untersuchten Stickstoff besteht in der wesentlich stärkeren Abkühlung des Systems während der Entspannungsphase. Dies lässt sich, bedingt durch den höheren Gaseintrag, mit einem stärker ausgeprägten Joule-Thomson-Effekt erklären. Ein damit zusammenhängendes zusätzliches Schädigungspotential ist denkbar.

Weitreichende Bedeutung hat Distickstoffoxid bisher in der Anästhesie erlangt. Es ist das älteste Inhalationsanästhetikum. Dabei wird besonders dessen gute Steuerbarkeit aufgrund des schnellen An- und Abflutens im Blutkreislauf (niedriger Blut-Gas-Verteilungskoeffizient) geschätzt [171]. Es wird vom Körper nicht verstoffwechselt und findet daher selbst bei Neugeborenen Anwendung [168]. Das wirksame Prinzip des Distickstoffoxids in der Anästhesie und Analgesie wird seit einigen Jahren kontrovers diskutiert. Früher wurde angenommen, dass aufgrund der guten Lipidlöslichkeit des Gases eine Fluidisierung der Lipiddoppelschichten von Nervenzellmembranen erfolgt und dadurch die pharmakodynamische Wirkung hervorgerufen wird. Heute werden Wechselwirkungen mit verschiedenen Rezeptoren und Ionenkanälen (NMDA-, GABA_A-, Opioid-Rezeptoren, Na-Kanäle) als ursächlich angesehen [172]. Neben der anästhetischen und analgetischen Wirkung von Distickstoffoxid ist auch eine Beeinträchtigung der Methionin-Synthetase in der Literatur beschrieben [172]. Dabei oxidiert das Distickstoffoxid das im Coenzym (Cobalamin, Vitamin B₁₂) komplexierte Co⁺-Ion zu Co³⁺. Die Methionin-Synthetase spielt eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Methylgruppen während der DNA- und RNA-Biosynthese. Bereits vor über 25 Jahren wurde der toxische und mutagene Einfluss von Distickstoffoxid auf Bakterien untersucht [173]. Mit steigendem Partialdruck konnte zwar eine Erhöhung der Zelltoxizität beobachtet werden, die durch den Zusatz von Sauerstoff oder Helium noch verstärkt wurde [174], ein mutagenes Risiko konnte mittels Ames-Test jedoch nicht nachgewiesen werden.

Trotz der in der Vergangenheit beobachteten Nebenwirkungen von Distickstoffoxid ergaben sich bezüglich der Arzneimittelsicherheit grundlegende positive Veränderungen. So existieren seit der 14. AMG-Novelle (2005) erstmals arzneimittelrechtliche Vorgaben für die medizinische Qualität von medizinischen Gasen, so auch von Distickstoffoxid. Die

Anforderungen an medizinisch verwendetes Distickstoffoxid hinsichtlich Sterilität, Qualitätskontrolle, Chargendokumentation und Gestaltung von Ab- und Umfüllprozessen sind nunmehr in Abgrenzung zum technisch verwendeten Distickstoffoxid geregelt. Die genauen Qualitätsanforderungen hinsichtlich Reinheit und Gehalt sind der Ph. Eur. 6.0 zu entnehmen. Der Gehalt an Stickstoffmonoxid und Stickstoffdioxid ist in diesem Zusammenhang auf maximal 2 ppm beschränkt. So kann durch die Verwendung von medizinischem Distickstoffoxid für die Druckwechselversuche ein toxischer Einfluss dieser Gase auf die Mikroorganismenzellen ausgeschlossen werden.

Hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit sowie des Umwelt- und Arbeitsschutzes ergeben sich im Vergleich zum Stickstoff deutliche Nachteile für die praktische Nutzung von Distickstoffoxid als Prozessgas für das Druckwechselverfahren. Eine Rückgewinnung aus dem Prozess ist daher wünschenswert und aus Sicht des Umweltschutzes sogar erforderlich, da Distickstoffoxid aufgrund seines Absorptionsspektrums ein hohes Treibhauspotential aufweist und damit zur Gruppe der klimarelevanten Gase zu zählen ist [170].

4.3.2.1 ABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES VON DER ART DER MIKROORGANISMEN

4.3.2.1.1 GRAMPOSITIVE BAKTERIEN

Bacillus atropheus

In Analogie zu den mit Stickstoff durchgeführten Versuchen wurde der Einfluss der Mikroorganismenart ebenfalls bei 25°C, 500 bar und einer maximalen Druckhaltezeit von 120 min durchgeführt. Wie bereits bei den Stickstoff-Versuchen beschrieben, wurden auch einige Distickstoffoxid-Versuche zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit mehrfach wiederholt. Im Gegensatz zu diesen war jedoch unter Verwendung von Distickstoffoxid eine deutlich bessere Reproduzierbarkeit zu erzielen. Ebenso konnte das Ausmaß der Zellreduktion mit ca. 6 Zehnerpotenzen deutlich verbessert werden. Diese Verbesserung ist nicht, wie zunächst angenommen, durch die bessere Gaslöslichkeit und dem damit verbundenen höheren intrazellulären Druck während der Entspannung zu erklären, da die Gesamtzellzahl, erkennbar an der optischen Dichte, nicht in dem Maße abnahm, wie es die Zahl der lebensfähigen Keime vermuten ließ. Vielmehr beruht sie auf einem zusätzlichen toxischen Effekt des Distickstoffoxids auf die Zellen von *B. atropheus*. Die mikroskopische Analyse mittels Live/Dead-Färbung bestätigte diese Annahme (Abb. 73). Inwiefern fluidisierende Effekte des Distickstoffoxides auf die Zellmembranen [150] oder Wechselwirkungen mit membranständigen Molekülen zu der irreversiblen Zellschädigung

geführt haben, konnte dabei nicht geklärt werden. Auffällig ist, dass trotz einer deutlichen Abnahme der optischen Dichte die Zahl der Zellen über den gesamten Druckwechselprozess konstant blieb.

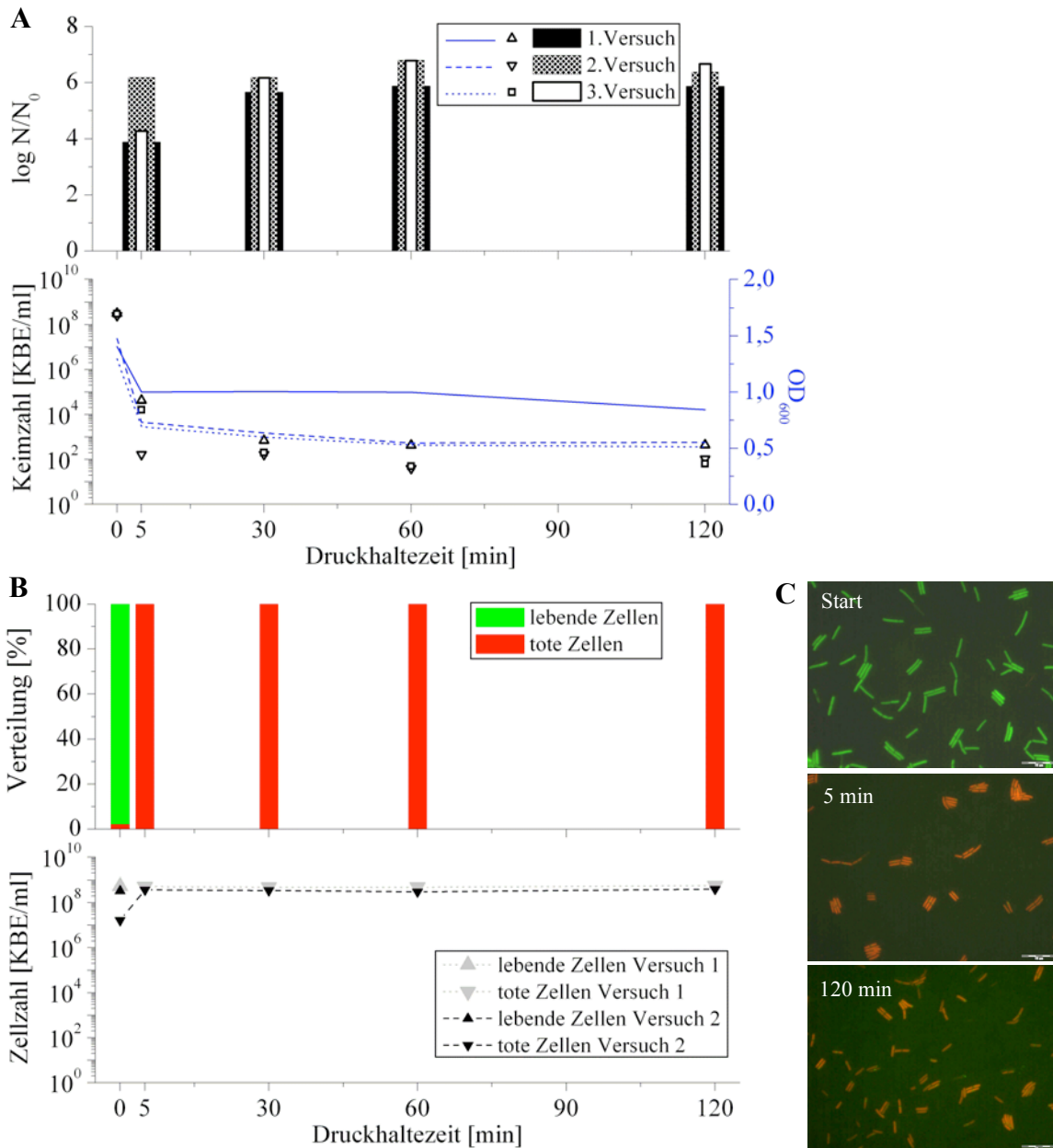


Abb. 73: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei drei verschiedenen *B. atrophaeus* Kulturen; Prozessgas: N_2O ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); **A:** Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; **B:** qualitative und quantitative Auswertung des 1. und 2. Versuchs mittels Live/Dead-Färbung (bei der prozentualen Verteilung ist nur der Mittelwert aus beiden Versuchen dargestellt); **C:** mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 1.000-fach

Dies widerspricht den bisherigen Überlegungen bezüglich der angenommenen intrazellulären Druckverhältnisse während der Entspannung, wonach durch die große Menge an intrazellulär gelöstem Gas ein Großteil der Zellen hätte zerstört werden müssen. Zwei Ursachen sind dafür denkbar: Zum einen könnte eine sehr schnelle Rückdiffusion des frei

werdenden Gases in das äußere Medium erfolgen und somit eine starker intrazellulärer Druckanstieg vermieden werden. Zum anderen könnten, wie in Kap. 4.3.1.11 beschrieben, vorgelagerte Zellschädigungen ein Zerplatzen während der Entspannung verhindern.

Im Vergleich zu den mit Stickstoff erhaltenen Werten ist auffällig, dass die durch Distickstoffoxid erzielte Reduktionsrate mit zunehmender Druckhaltezeit ebenfalls eine Zunahme erfährt. Dies kann ein Hinweis auf eine verzögerte Gasdiffusion sein, aber auch auf das Vorhandensein von resistenteren Keimen, die erst durch eine längere Druckhaltezeit erfasst werden, hindeuten. Letzteres wird auch für die Inaktivierung mit Kohlendioxid angenommen [175].

Darüber hinaus konnte anhand der *B. atrophaeus* Versuche ein Vergleich der beiden verwendeten Autoklaven Premex und Parr vorgenommen werden. Dabei fiel auf, dass trotz weniger baulicher Unterschiede die Premex-Anlage deutlich bessere Ergebnisse lieferte (Abb. 74).

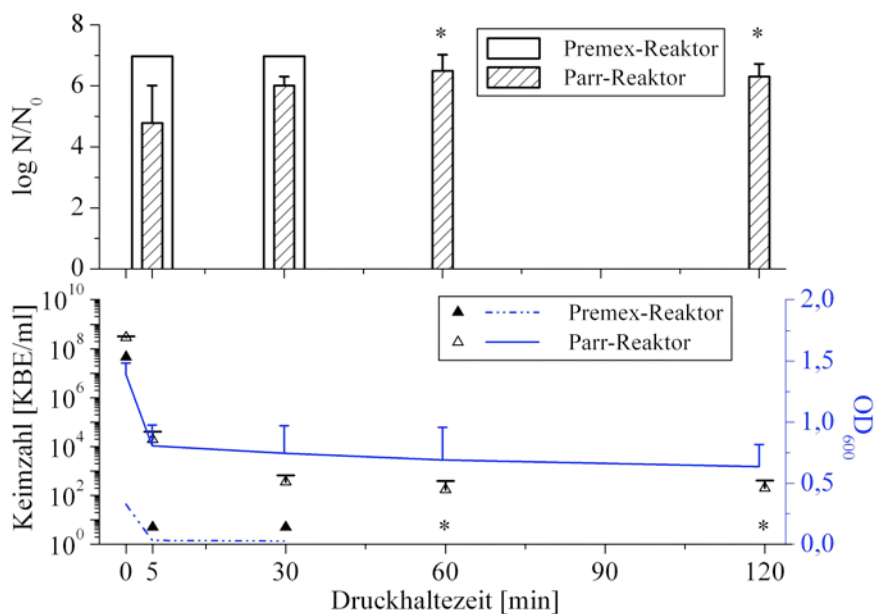


Abb. 74: Vergleich der erzielten Keimzahlreduktion in Abhängigkeit von den verwendeten Autoklaven; Prozessgas: N₂O; Druck: 500 bar; (Ergebnisse des Parr-Autoklaven: $\bar{x} + s$; n= 3; *aufgrund des zu geringen Restvolumens war keine Probenahme möglich)

Die wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Anlagen liegen im Fassungsvermögen (Premex: 500 ml; Parr: 1.300 ml), in den verwendeten Ventilen (Premex: Sitec; Parr: Swagelok), in der Verrohrung für den Gaseintrag (Premex: in den Kopfraum des Autoklaven; Parr: über ein Tauchrohr in das Medium) sowie in der Länge des Steigrohres für die Probenahme. Da jedoch das Probenvolumen so angepasst wurde, dass das Volumenverhältnis Gasraum/Flüssigkeit annähernd konstant blieb (Premex: 250 ml; Parr: 500 ml), ist dieser Unterschied zu vernachlässigen. Vermutlich haben bauliche

Unterschiede zwischen den Ventilen und deren manuelle Handhabung den größeren Einfluss auf die Keimzahlreduktion. Nicht auszuschließen ist auch ein negativer Einfluss eines zu langen Steigrohres, da durch den strömungsbedingten Druckabfall bei steigender Passagezeit die Möglichkeit eines langsamen Ausgasens erhöht wird.

Bacillus pumilus

Wie bereits bei der Darstellung der Stickstoff-Ergebnisse beschrieben, erfolgte die Druckwechselbehandlung von *B. pumilus* wie auch *G. stearothermophilus* im Premex-Autoklaven mit den beschriebenen Kapazitätseinschränkungen bezüglich des zu behandelnden Volumens. Eine deutliche Reduktion der Lebendzellzahl von *B. pumilus* war erstmals unter Verwendung von Distickstoffoxid möglich. Aber auch hier ging die Inaktivierung der Zellen im Wesentlichen nicht mit einer Zerstörung durch den Druckwechselprozess einher, wie an der vergleichsweise hohen optischen Dichte erkennbar ist (Abb. 75). Dennoch ist auch die Reduktion der optischen Dichte deutlich stärker ausgeprägt als es bei der Verwendung von Stickstoff zu beobachten war. Vergleiche mit den Reduktionsergebnissen von *B. atropheus* ergaben, wie zuvor bereits für Stickstoff beschrieben, auch unter Verwendung von Distickstoffoxid ein deutlich schlechteres Ansprechverhalten von *B. pumilus* auf den Druckwechselprozess, obwohl sich das zahlenmäßig größere A/V-Verhältnis durch den toxischen Effekt von Distickstoffoxid nachteilig auf die Zelle auswirken müsste.

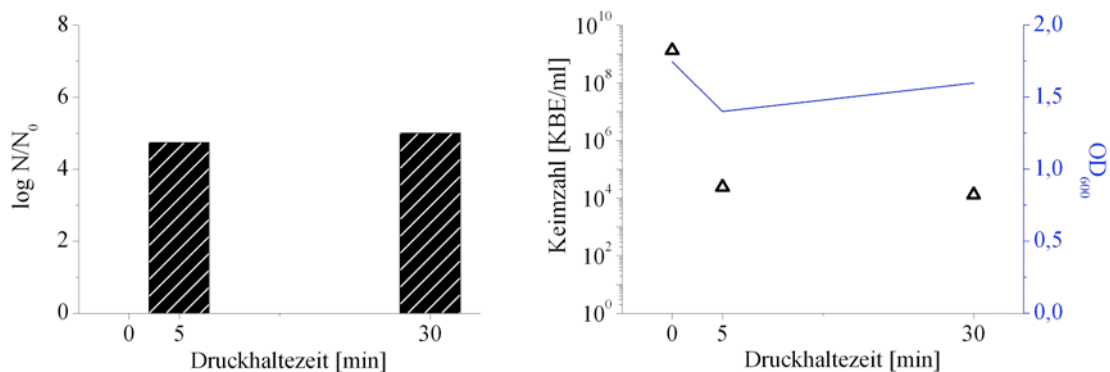


Abb. 75: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *B. pumilus* Kultur; Prozessgas: N_2O ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang; siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte

Geobacillus stearothermophilus

Die Ergebnisse mit *G. stearothermophilus* entsprechen denen der anderen aeroben Bakterien. Auch hier war eine deutliche Steigerung des Reduktionserfolges gegenüber der mit Stickstoff behandelten Probe zu erkennen (Abb. 76). Darüber hinaus ist die für mit

Stickstoff behandelten Kulturen von *B. atropheus*, *B. pumilus* und *G. stearothermophilus* gefundene Reihung direkt auf die Distickstoffoxid-Ergebnisse übertragbar. Auch hier zeigt sich, dass eine Zunahme der pro Volumeneinheit zur Verfügung stehenden Oberfläche eine Abnahme der Reduktionsrate zur Folge hatte. Dieses Ergebnis überrascht, weil die toxische Wirkung des Distickstoffoxids als wirkungsbestimmende Größe eher das Gegenteil erwarten ließ. Trotz des ausgeprägten toxischen Inaktivierungseffekts stieg aber auch die Zahl der während der Entspannung zerplatzten Zellen. Die im Vergleich zum Stickstoffversuch deutlich stärkere Abnahme der optischen Dichte ist ein Beleg dafür. Eine abschließende Bewertung kann an dieser Stelle aufgrund der fehlenden Vergleichsmöglichkeiten mit Daten aus der Live/Dead-Färbung nicht erfolgen. Dass diese Vergleiche jedoch notwendig sind, zeigten die bereits dargestellten *B. atropheus* Ergebnisse sehr deutlich, wo trotz massiver Abnahme der optischen Dichte die Gesamtzellzahl annähernd konstant blieb.

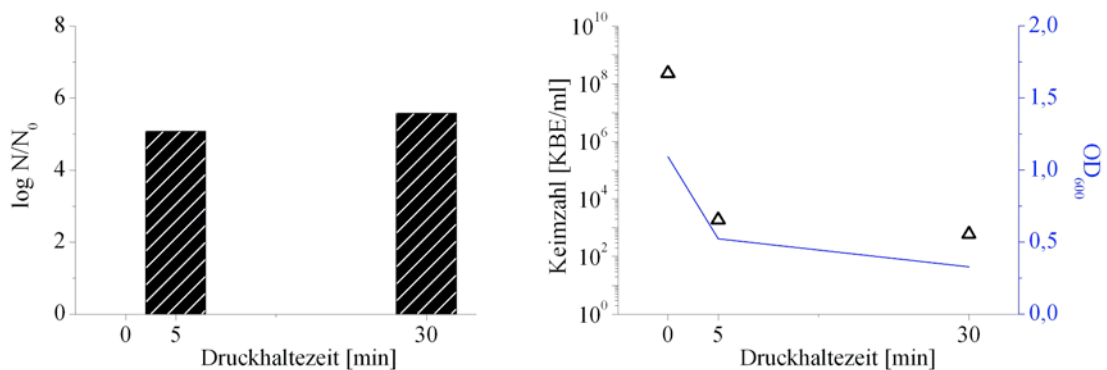


Abb. 76: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *G. stearothermophilus* Kultur; Prozessgas: N_2O ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatellplattenverfahrens und der optischen Dichte

Staphylococcus aureus ssp. *aureus*

S. aureus als weiterer Vertreter der grampositiven Mikroorganismen entspricht in seiner Empfindlichkeit gegenüber dem eingesetzten Distickstoffoxid dem Verhalten der anderen Mikroorganismen in dieser Gruppe (Abb. 77). Ähnlich den *B. atropheus* Versuchen war auch hier eine Steigerung der Reduktionsrate in Abhängigkeit von der Druckhaltezeit zu erkennen, wobei das Maximum nach einer Druckhaltezeit von 60 min erreicht wurde. Die anfänglich geringeren Reduktionsraten sind dabei wahrscheinlich auf das Vorhandensein besonders robuster Zellen oder Zellaggregate zurückzuführen; die Ergebnisse der Live/Dead-Färbung bestätigen dies. Das mikroskopische Bild nach 5 min Druckhaltezeit weist neben toten Einzelzellen Zellverbände mit lebenden Zellen auf. Somit ist die

Diffusion des gelösten Gases in die durch den Zellverband geschützten Zellen als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt anzusehen.

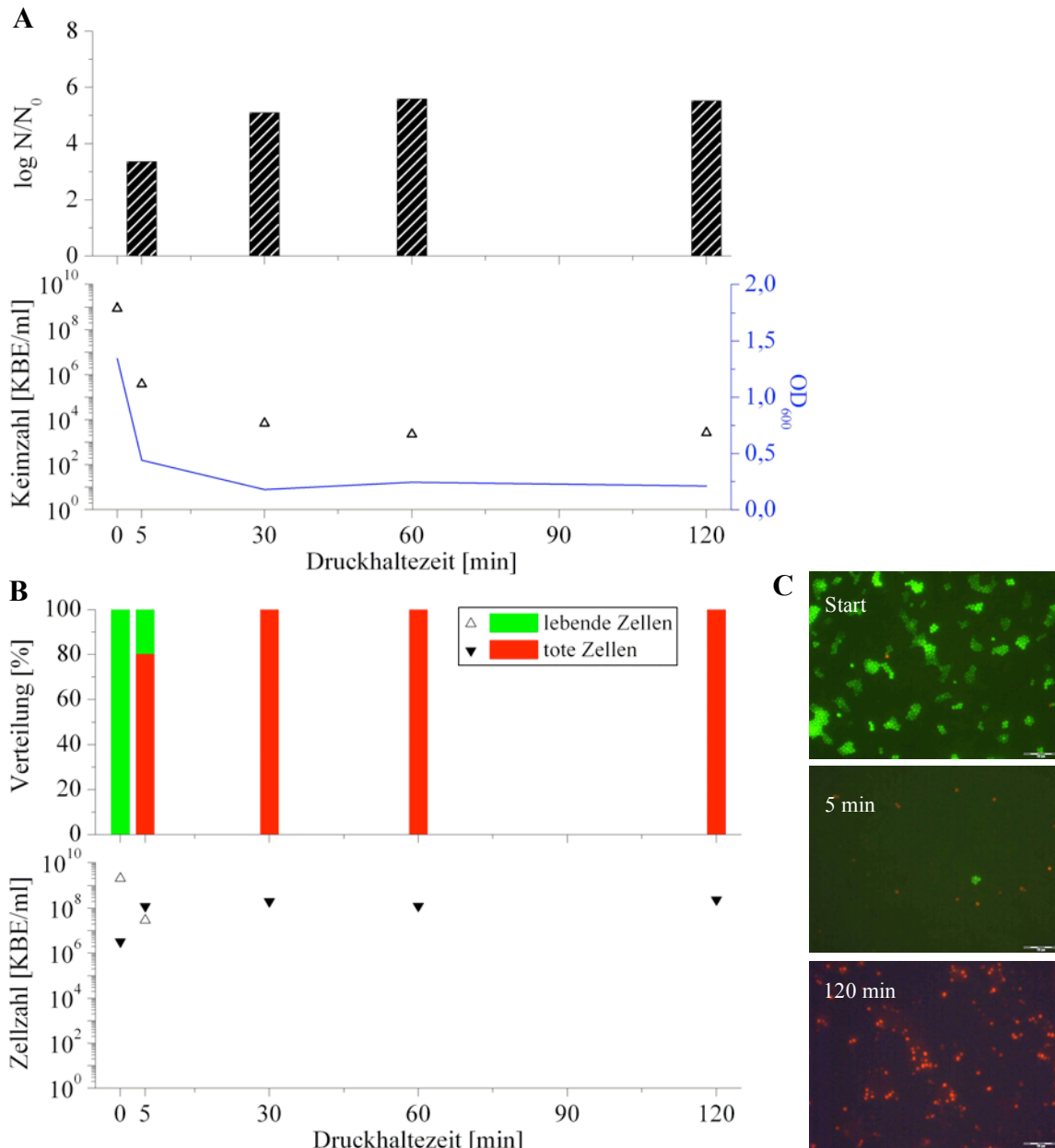


Abb. 77: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *S. aureus* Kultur; Prozessgas: N₂O; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung; C: mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 1.000-fach

Die Abnahme der optischen Dichte korreliert im Gegensatz zu den mit *B. atrophaeus* erhaltenen Ergebnissen sehr gut mit der Abnahme der Gesamtzellzahl. Aus dem Stickstoffversuch ist bekannt, dass eine Abnahme der optischen Dichte um ca. 1,25 einer Zellzahlreduktion von einer Zehnerpotenz entspricht. Eine Reduktion in dieser Größenordnung konnte auch mit Distickstoffoxid erreicht werden. Dass trotz der

wesentlich höheren Gelöstgasmenge kein deutlich höherer Zerstörungsgrad erreicht wurde, lässt eine schnelle Rückdiffusion des freigesetzten Gases während der Entspannung vermuten.

Clostridium sporogenes

C. sporogenes wies als einziger obligat anaerob lebender Keim innerhalb der untersuchten Gruppe der grampositiven Keime ein deutlich schlechteres Absterbeverhalten auf (Abb. 78). Eine Erhöhung der Effektivität durch den Austausch von Stickstoff gegen Distickstoffoxid als Prozessgas war nicht zu erkennen. In beiden Versuchen lag die erreichte Reduktionsrate bei ca. 90 %. Die mit der Reduktion der Lebendzellzahl einhergehende Verringerung der optischen Dichte deutet dabei auf ein Zerplatzen der Zellen hin. Verglichen mit den *S. aureus* Ergebnissen ist das Ausmaß der Zellschädigung durch Zerplatzen damit annähernd gleich groß.

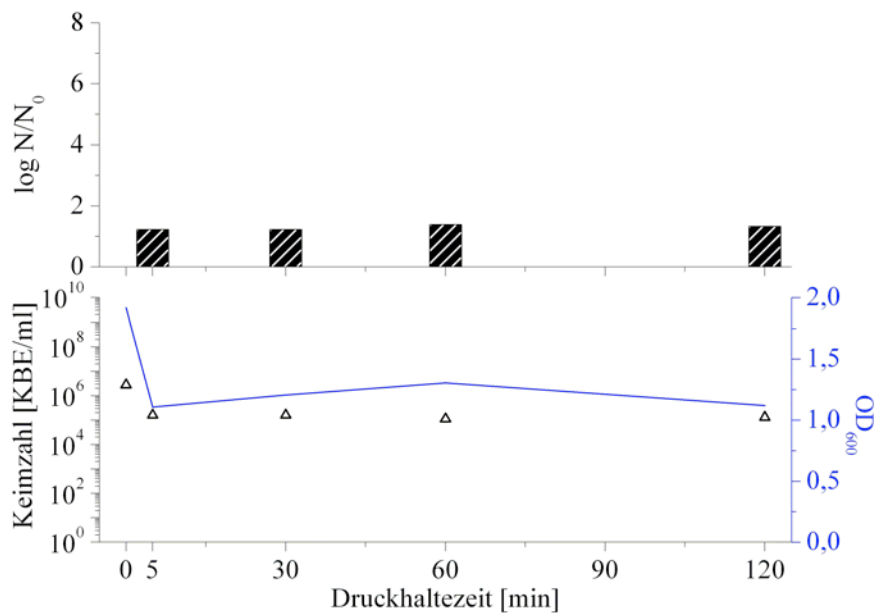


Abb. 78: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *C. sporogenes* Kultur; Prozessgas: N₂O; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte

Die Wirkung des Distickstoffoxids setzt sich demnach nicht, wie bei aeroben Bakterien zu beobachten, aus einer physikalischen und einer chemischen Komponente zusammen, sondern ist nur auf eine rein physikalische Schädigung der Zellwand zurückzuführen.

Zum besseren Verständnis der Schädigungsmechanismen ist ein Vergleich zwischen aerob und anaerob lebenden Bakterien notwendig. Der wesentlichste Unterschied dieser beiden Bakteriengruppen liegt in der Art der Energiegewinnung. Obligat aerobe Mikroorganismen beziehen ihren Energiebedarf ausschließlich aus der Atmung, während die anaerob

lebenden Mikroorganismen ihren Energiebedarf über die weniger effiziente Gärung abdecken. Eine Zwischenform stellt die Gruppe der fakultativ anaeroben Mikroorganismen dar. Je nach Nährstoffangebot können diese sowohl die Atmung als auch die Gärung zur Energiegewinnung nutzen. Für obligat anaerobe Mikroorganismen ist Sauerstoff toxisch; in Abgrenzung hierzu ist für aerotolerante und mikroaerophile Mikroorganismen eine niedrige Sauerstoffkonzentration tolerabel bzw. für das Wachstum notwendig.

Daraus ergibt sich nicht nur, dass Distickstoffoxid trotz des vorhandenen oxidativen Potentials keinen toxischen Einfluss auf den obligat anaeroben Keim *C. sporogenes* ausübt, sondern auch, dass für den bei aeroben Mikroorganismen beobachteten toxischen Effekt eine Störung der Zellatmung denkbar ist.

4.3.2.1.2 GRAMNEGATIVE BAKTERIEN

Brevundimonas diminuta

In Anlehnung an die *B. atropheus* Versuche wurden Untersuchungen an *B. diminuta* zur Bestimmung der Robustheit des Verfahrens durchgeführt. Auch hier konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden (Abb. 79).

Auffällig war, wie generell bei allen Distickstoffoxid-Versuchen, dass die maximale Keimzahlreduktion erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wird als es mit Stickstoff als Prozessgas zu beobachten war. Da es trotz der wesentlich dünneren Bakterienhülle zu dieser zeitlichen Verzögerung kam, ist eine behinderte Diffusion als Ursache auszuschließen. Insgesamt war ein vergleichbares Verhalten grampositiver und gramnegativer Zellen zu beobachten. Sowohl die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Reduktion als auch deren Ausmaß unterschieden sich nicht wesentlich beim Vergleich der beiden Gruppen.

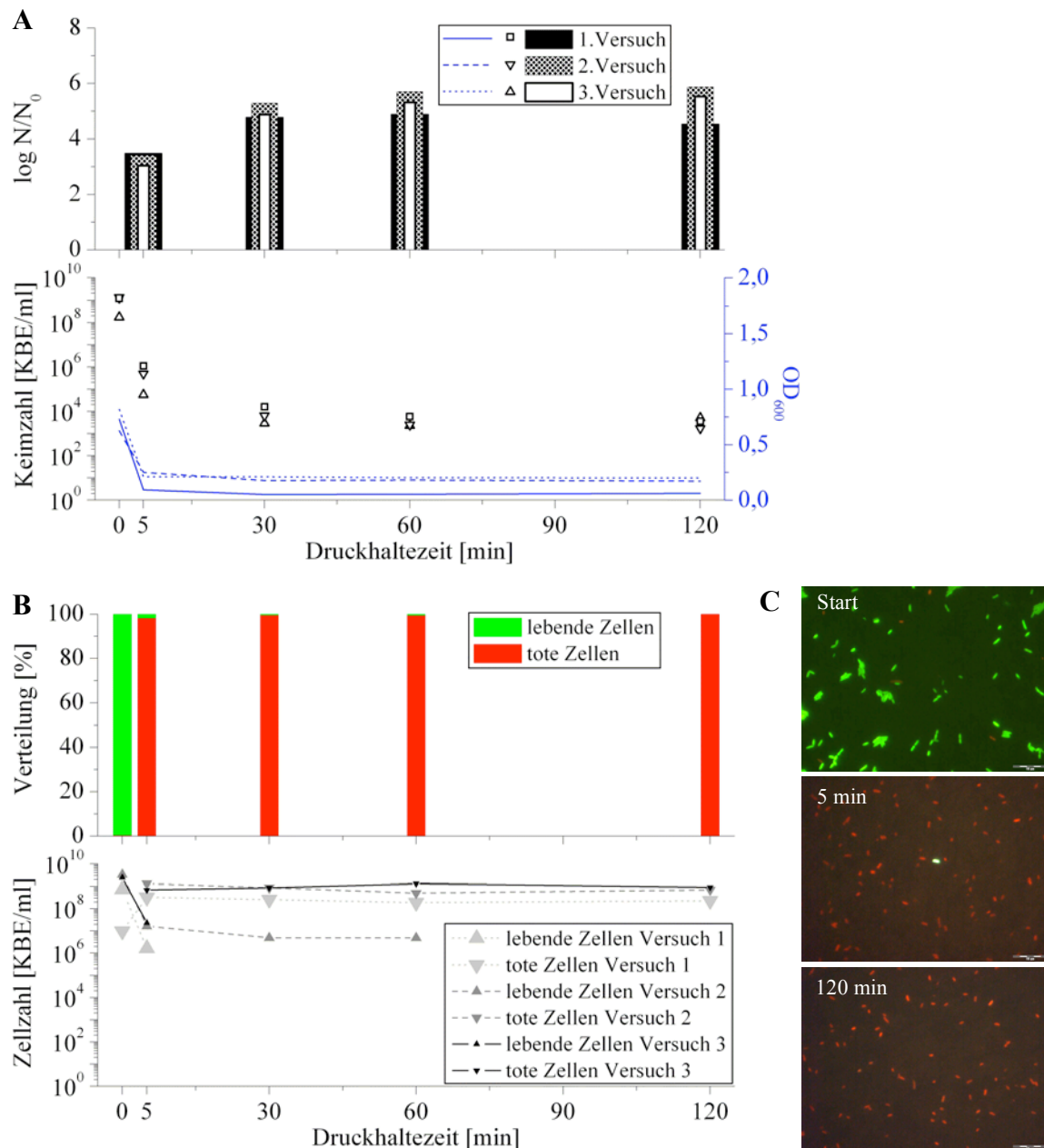


Abb. 79: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei drei verschiedenen *B. diminuta* Kulturen; Prozessgas: N_2O ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung mittels Live/Dead-Färbung (Verteilung: \bar{x} ; $s \leq 1,41$ %); C: mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 1.000-fach

Pseudomonas aeruginosa

Die Reduktion vegetativer *P. aeruginosa* Zellen im Druckwechselprozess mit Distickstoffoxid verlief identisch mit der von *B. diminuta*. Die maximale Reduktion wurde auch hier nach 60 min erreicht, und auch das Ausmaß der Reduktion mit 6 Zehnerpotenzen ist vergleichbar. Die starke Schädigung der Zellen im Druckwechselprozess verhinderte eine quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung (Abb. 80 C). Die in Abb. 80 B

dargestellte Verteilung gibt daher lediglich den subjektiven Eindruck bei der Betrachtung des mikroskopischen Präparates wieder.

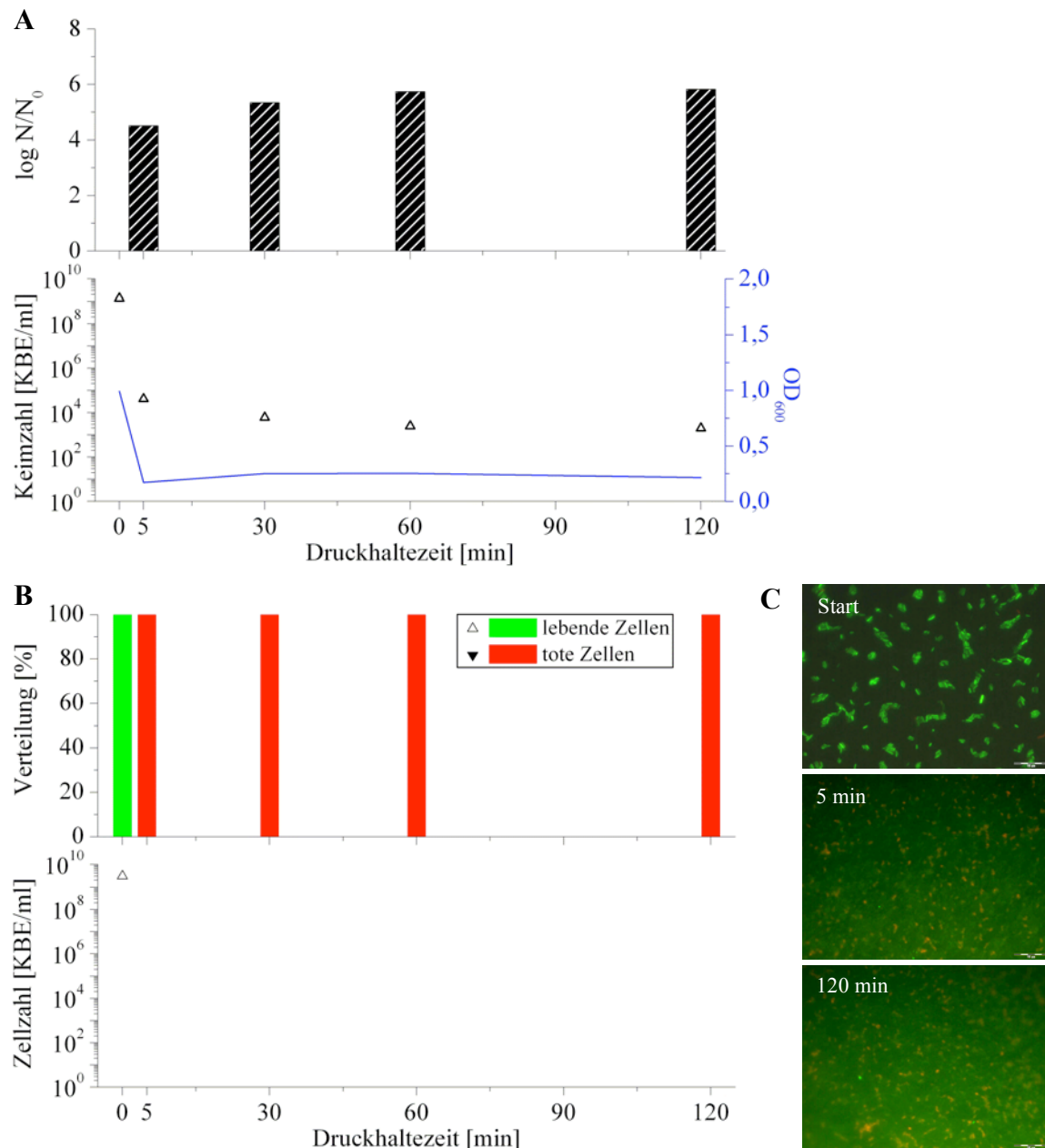


Abb. 80: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *P. aeruginosa* Kultur; Prozessgas: N₂O; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative Auswertung der Live/Dead-Färbung; C: mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 1.000-fach

4.3.2.1.3 PILZE

Aspergillus niger

Aus den bereits genannten Gründen kamen auch bei den Untersuchungen mit Distickstoffoxid vorgekeimte *A. niger* Sporensuspensionen zum Einsatz. Die Ergebnisse entsprachen in ihrer Tendenz denen, die mit Stickstoff als Prozessgas erhalten wurden

(Abb. 81). Die über 8 h angekeimten Sporen wiesen auch hier die höchste Absterberate auf. Insgesamt war jedoch eine deutlich höhere Keimzahlreduktion zu beobachten. Die Gründe für das ungleiche Verhalten der unterschiedlich lang angekeimten Sporensuspensionen entsprechen den bereits bei der Bewertung der Stickstoff-Versuche genannten.

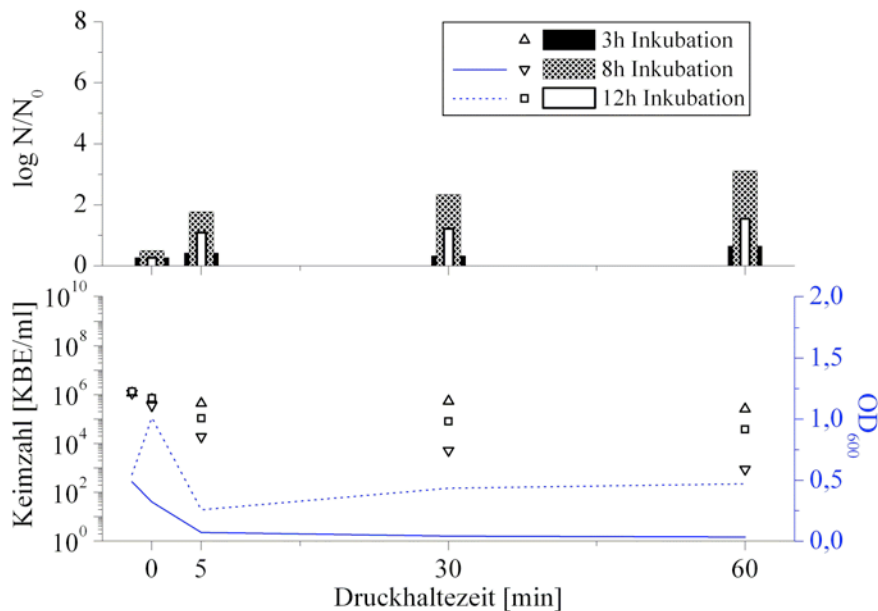


Abb. 81: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei *A. niger* Kulturen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Sporensuspensionen; Prozessgas: N₂; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens

Candida albicans

Versuche mit *C. albicans* ergaben sehr hohe Keimreduktionsraten bei kaum verringerter optischer Dichte (Abb. 82). Die fast unveränderte optische Dichte ist ein unerwartetes Ergebnis, welches auf einen im Vergleich zu den anderen Keimen ausschließlich chemischen bzw. toxikologischen Abtötungsprozess bei Hefen hindeutet. Das Fehlen der physikalischen Komponente bei der Inaktivierung der Zellen lässt sich, wie bereits beschrieben, mit der wesentlich höheren mechanischen Festigkeit der Pilzzellwände erklären.

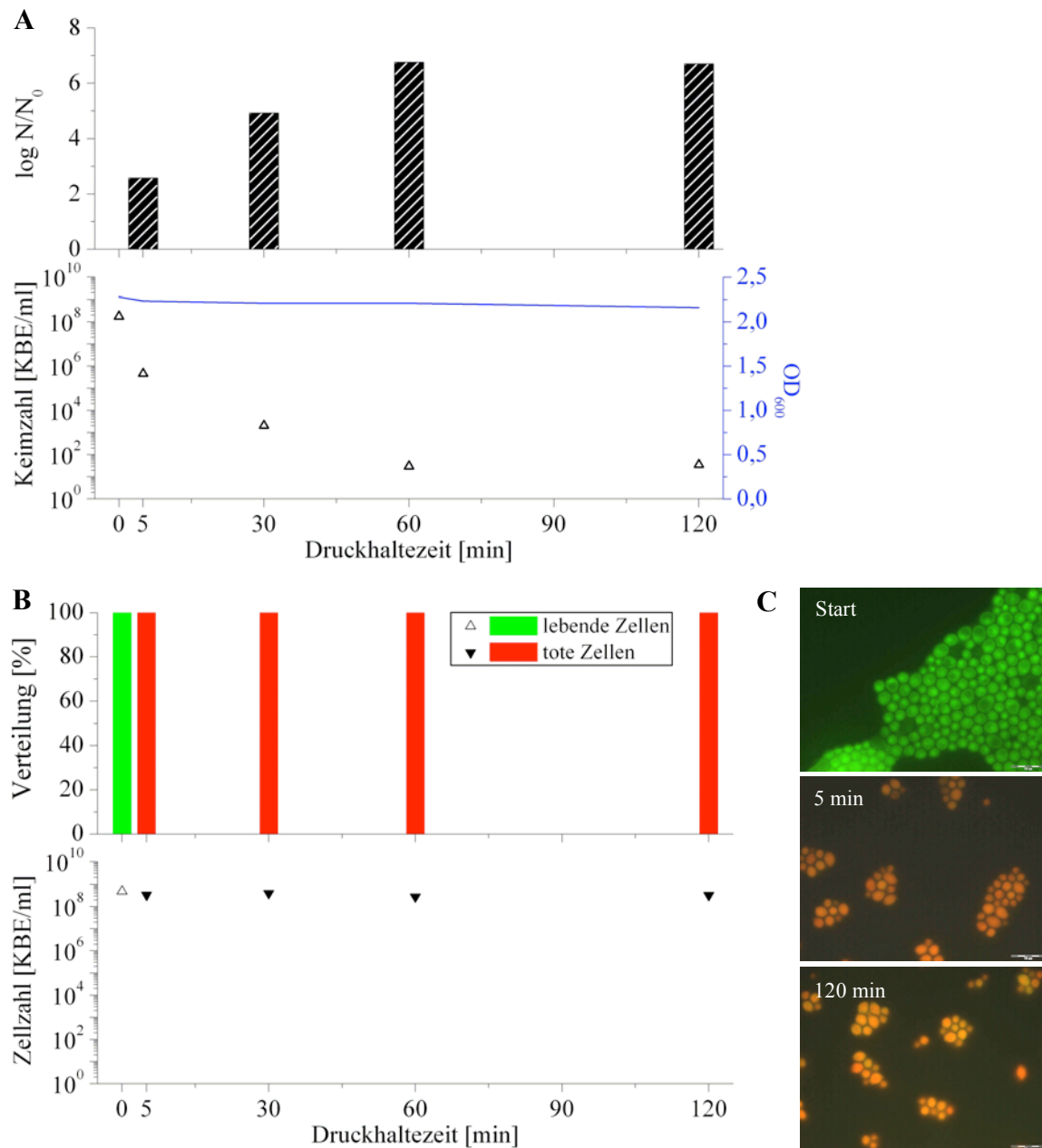


Abb. 82: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *C. albicans* Kultur; Prozessgas: N₂O; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung; C: mikroskopische Bilder nach Live/Dead-Färbung im Fluoreszenzlicht, Vergrößerung: 1.000-fach

4.3.2.1.4 ZUSAMMENFASSUNG

Die Keimzahlreduktion mittels Distickstoffoxid als Prozessgas fiel bei allen betrachteten aeroben Bakterien vergleichbar hoch aus. Die etwas geringere Reduktionsrate von *B. pumilus* war auf die verkürzte Prozesszeit zurückzuführen. Die Erfahrungen aus den anderen Versuchen ließen jedoch eine vergleichbar hohe Reduktionsrate nach einer Druckhaltezeit von 60 min vermuten. Deutliche Abweichungen waren nur bei *C. sporogenes* und *A. niger* aus den genannten Gründen zu beobachten. Bei allen

Versuchen war eine zeitabhängige Abtötung festzustellen. Dass diese nicht auf unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten zurückzuführen war, konnte durch den Vergleich grampositiver und gramnegativer Bakterien belegt werden. Eine Bestimmung der zugrundeliegenden Kinetik, wie sie für die Keiminaktivierung mit überkritischem Kohlendioxid beschrieben ist [167], war nicht möglich. Die Ursache hierfür liegt im Inaktivierungsprozess begründet. Dieser setzt sich je nach betrachtetem Keim aus bis zu zwei Teilprozessen zusammen, der physikalischen Zerstörung durch Zerplatzen und einer Abtötung durch toxische Effekte des verdichteten Distickstoffoxids. Den toxischen Effekten können wiederum verschiedene Mechanismen, wie die Modifizierung der Zellmembran, Enzyminaktivierungen oder die Extraktion von Zellbestandteilen zugrundeliegen. Wie die dargestellten Ergebnisse belegen, variiert sowohl die physikalische als auch die toxisch/chemische Komponente sehr stark. So war bei *B. atrophaeus* und *B. diminuta* ein Zerplatzen der Zellen überhaupt nicht nachweisbar, bei *C. sporogenes* hingegen die einzige Ursache für die Keimzahlreduktion.

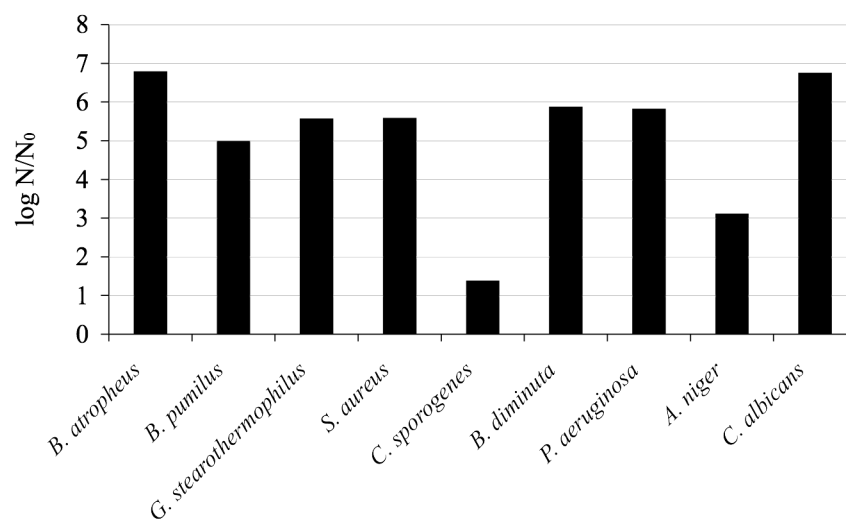


Abb. 83: Maximal erreichte Keimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Art der Mikroorganismen mit Distickstoffoxid als Prozessgas bei RT und einem Druck von 500 bar

Anhand der vorliegenden Daten war eine Reaktionskinetik 1. Ordnung, wie sie zur Beschreibung der Keimzahlreduktion bei thermischen Sterilisationsprozessen Anwendung findet, auszuschließen.

4.3.2.2 ABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES VON DER GELÖSTGASMENGE

Die oberhalb des Verflüssigungsdruckes nur noch geringe Zunahme der Gaslöslichkeit lässt eine ebenfalls geringe Zunahme der Keimzahlreduktion bei Erhöhung des Prozessdruckes erwarten. Zur Erhöhung der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens wurde dieser

Zusammenhang mit dem Ziel untersucht, einen Prozessdruck zu definieren, der einerseits für eine sichere Keimabtötung erforderlich ist, andererseits aber die notwendige Distickstoffoxiddmenge auf ein Minimum begrenzt. Zu diesem Zweck wurden Versuche bei 200, 300, 400 und 500 bar durchgeführt. Wie aus Abb. 84 ersichtlich ist, ist der Behandlungserfolg mit Distickstoffoxid innerhalb der untersuchten Druckspanne kaum vom eingesetzten Druck abhängig.

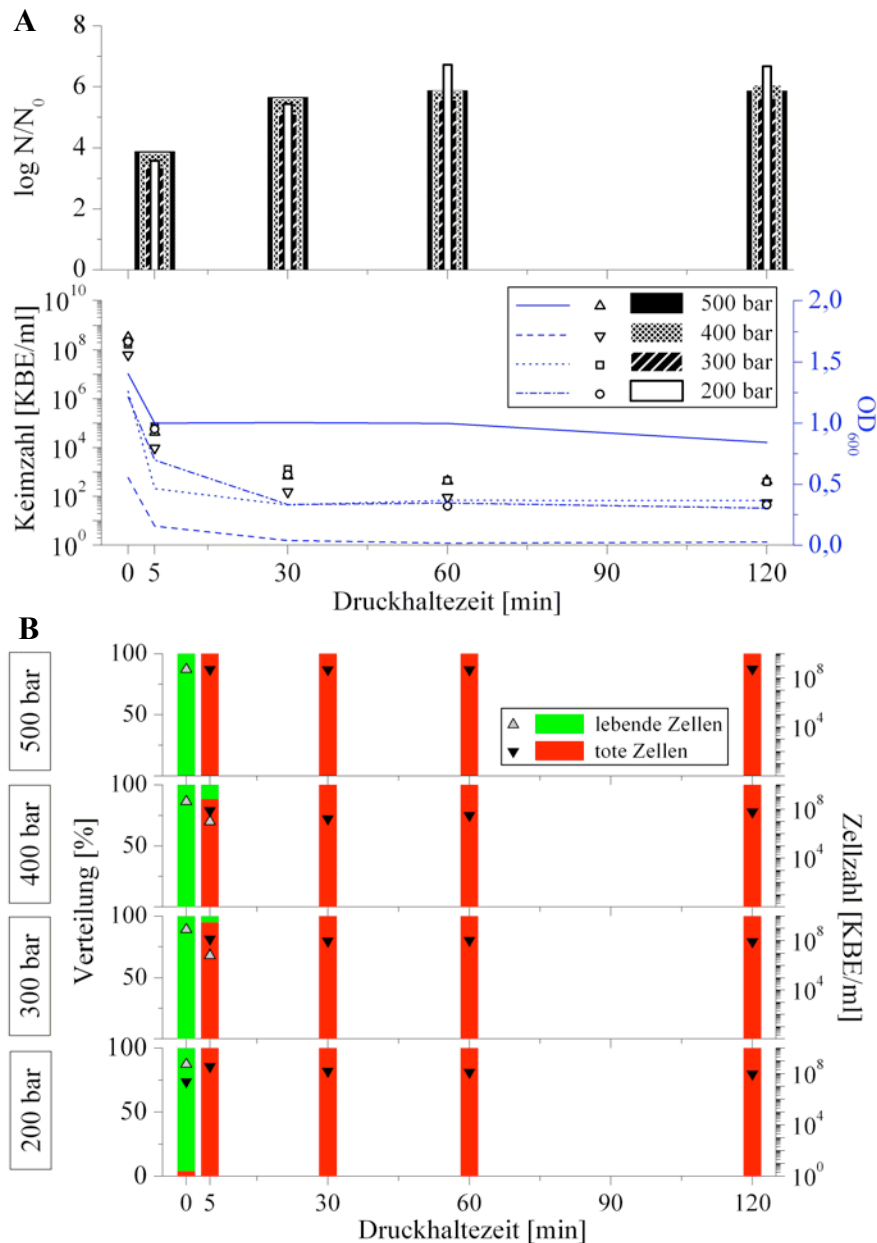


Abb. 84: Keimzahlreduktion verschiedener *B. atrophaeus* Kulturen in Abhängigkeit vom verwendeten Druck; Prozessgas: N₂O; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

Eine Beschleunigung der Inaktivierung und damit verbunden eine mögliche Verkürzung der erforderlichen Druckhaltezeit konnte mit einer Erhöhung des Prozessdruckes ebenfalls

nicht erzielt werden. Dies deutet wiederum auf einen chemischen bzw. toxikologischen Abtötungsmechanismus hin, der in den betrachteten Grenzen nicht von der Konzentration des gelösten Gases abhängig ist.

Für einen späteren Routinebetrieb ist diese Erkenntnis von besonderer Bedeutung, weil nicht nur die Kosten für den Anlagenbau erheblich reduziert werden können, sondern sich auch die pro Volumeneinheit Sterilisationsgut benötigte Menge Distickstoffoxid verringert. Zudem ist die Verminderung des Wärmeeintrags als Folge eines verringerten Gaseintrags bei einer nicht-thermischen Prozessführung positiv zu bewerten.

4.3.2.3 TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DES ABTÖTUNGSERFOLGES

Mit dem Prozessgas Distickstoffoxid wurden im Vergleich zu Stickstoff lediglich die Temperaturen 25 und 40°C untersucht. Aufgrund der eingeschränkten apparativen Möglichkeiten am Parr-Autoklav war eine Versuchsführung bei 10°C leider nicht möglich. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass bei einer Prozesstemperatur von 40°C die kritische Temperatur von Distickstoffoxid überschritten wird und das Gas somit in überkritischem Zustand als Fluid zur Anwendung kam.

Durch die Erhöhung der Prozesstemperatur auf 40°C und einer Druckhaltezeit von 120 min war erstmals die Sterilisation einer *B. atropheus* Probe möglich (Abb. 85). Im Gegensatz zu den mit Stickstoff erhaltenen Ergebnissen fällt hier besonders der deutlich wirkungsverstärkende Effekt der erhöhten Temperatur auf. Darüber hinaus war bei einer Prozesstemperatur von 40°C im Gegensatz zu den bei Raumtemperatur durchgeführten Versuchen eine deutliche Zellzahlreduktion zu beobachten. Die Abnahme der optischen Dichte und die Ergebnisse aus der Live/Dead-Färbung belegen dies. Die Wirkungsverstärkung setzt sich somit aus einer Verstärkung der beiden bereits diskutierten Teilprozesse, Zerplatzen und toxischer Effekt, zusammen.

Ob diese moderate Temperaturerhöhung auch bezüglich der Wirkstoffstabilität vertretbar ist, wurde in gesonderten Stabilitätsuntersuchungen an verschiedenen Modellarzneistoffen getestet (Kap. 5). Hinsichtlich der Prozessführung wäre eine Prozesstemperatur von 40°C wünschenswert, da einerseits die eingebrachte Kompressionswärme nicht abgeführt werden müsste und sich andererseits durch den überkritischen Zustand des Gases die für einen Druck von 500 bar notwendige Gasmenge reduzieren würde.

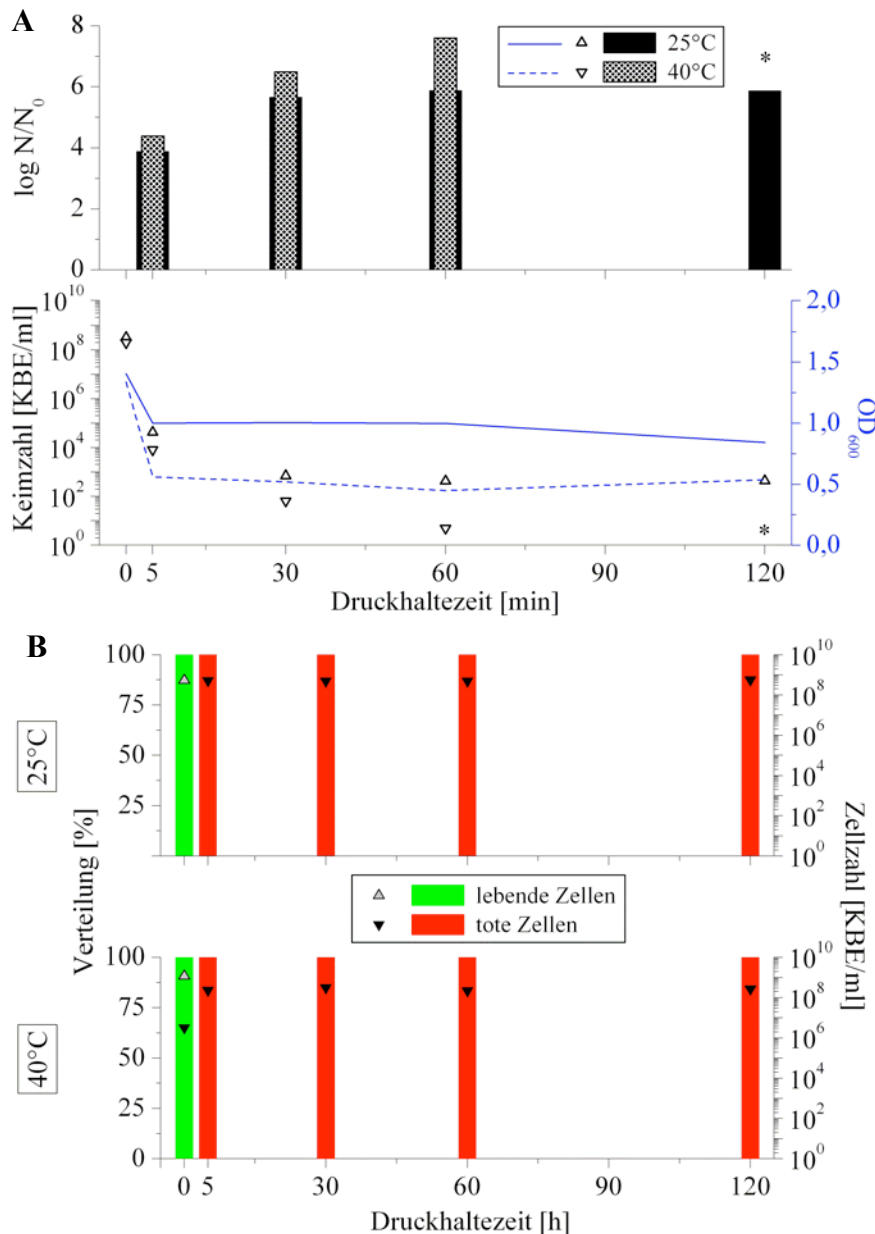


Abb. 85: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *B. atropheus* Kultur in Abhängigkeit von der Temperatur; Prozessgas: N₂O; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte (* keine lebensfähigen Mikroorganismen detektierbar); B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

Im Gegensatz zu den mit *B. atropheus* erhaltenen Daten konnte bei der Behandlung der *B. diminuta* Kultur unter Erhöhung der Prozesstemperatur keine Verbesserung des Absterbeverhaltens erzielt werden (Abb. 86). Die bei 40°C erhaltenen Reduktionsraten blieben sogar knapp unterhalb des bei Raumtemperatur erreichten Wertes, was, wie bereits diskutiert, auf eine Fluidisierung der Zellmembran zurückzuführen sein könnte. In nachfolgenden Untersuchungen müsste geklärt werden, ob eine Temperaturniedrigung die Reduktionsrate in dem Maße erhöhen kann, wie es für eine sichere Sterilisation

erforderlich wäre. Die mit Stickstoff bei 10°C durchgeführten Versuche lassen dies vermuten.

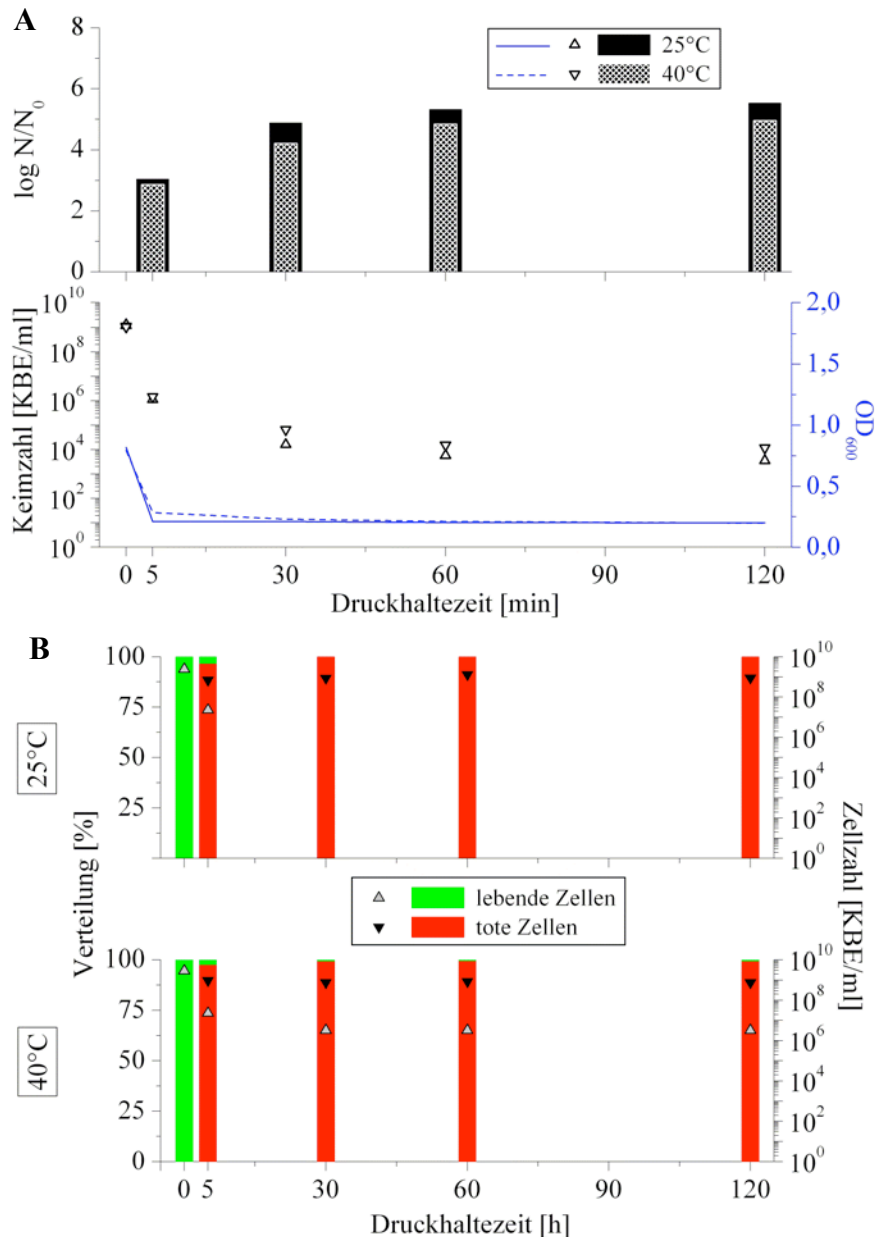


Abb. 86: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei einer *B. diminuta* Kultur in Abhängigkeit von der Temperatur; Prozessgas: N₂O; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung

4.3.2.4 EINFLUSS DER AUSGANGSKEIMZAHL

Die im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss der Art der Mikroorganismen erhaltenen, mit ca. 10³ KBE/ml relativ konstanten, Restkeimzahlen, ließen einen systematischen Fehler im Versuchsaufbau vermuten. Ausgehend von einer Startkeimzahl von 10⁸ KBE/ml würden 0,7 µl unbehandelte Keimsuspension genügen, um in 70 ml

keimfreiem Medium (übliche Probenahmemenge) eine Konzentration von 10^3 KBE/ml zu erzeugen. Bei einer verminderten Startkeimzahl von 10^5 KBE/ml wäre eine Restkontamination von 1 KBE/ml die Folge. Ausgehend von diesen Überlegungen wurden Druckwechselversuche an Kulturen mit einer Startkeimzahl von 10^8 KBE/ml bzw. 10^5 KBE/ml durchgeführt. Die Ergebnisse der *B. atrophaeus* Kulturen sind in Abb. 87 dargestellt. Überraschend war, dass beide Kulturen eine annähernd gleiche Restverkeimung aufwiesen. Die Eingangs dargestellten Überlegungen konnten daher nicht bestätigt werden und eine Kontamination durch im Druckwechselprozess nicht erfasste Keimsuspension infolge baulicher Unzulänglichkeiten ausgeschlossen werden. Auch ein konstanter Anteil an resistenten Keimen gegenüber dem Druckwechselverfahren in der Gesamtpopulation kann die erhaltenen Ergebnisse nicht erklären.

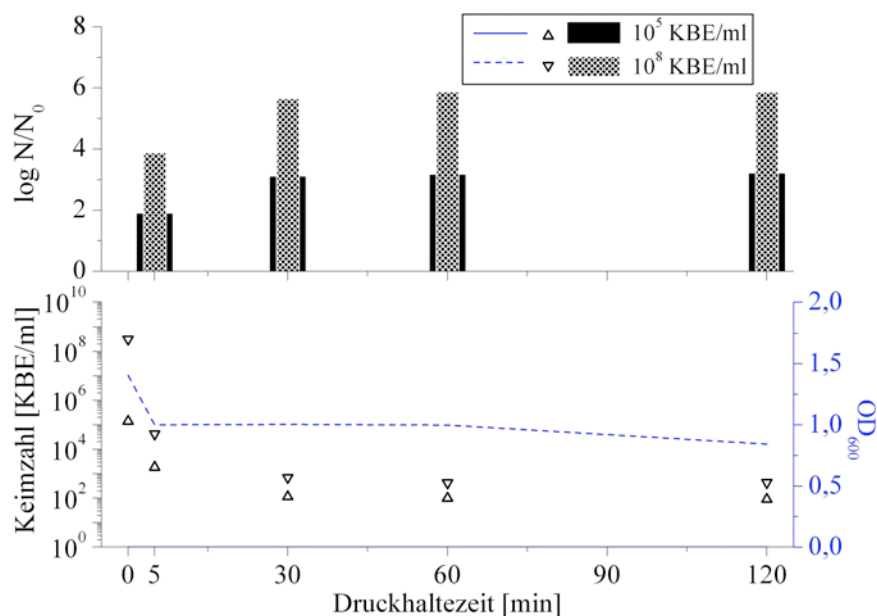


Abb. 87: Keimzahlreduktion von *B. atrophaeus* Kulturen in Abhängigkeit von der Zelldichte; Prozessgas: N_2O ; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang)

Die Wiederholung der Versuche mit *B. diminuta* ergab ein völlig anderes Bild. Nach einer Druckhaltezeit von 60 min konnten bei der verdünnten Probe keine lebensfähigen Keime mehr nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass bei den bisherigen Versuchen die Sensitivität der *B. atrophaeus* Zellen gegenüber dem Druckwechselverfahren höher war als die der *B. diminuta* Zellen, erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Eine Erhöhung der Anzahl an Versuchswiederholungen zur Bewertung der Robustheit des Verfahrens ist daher unumgänglich.

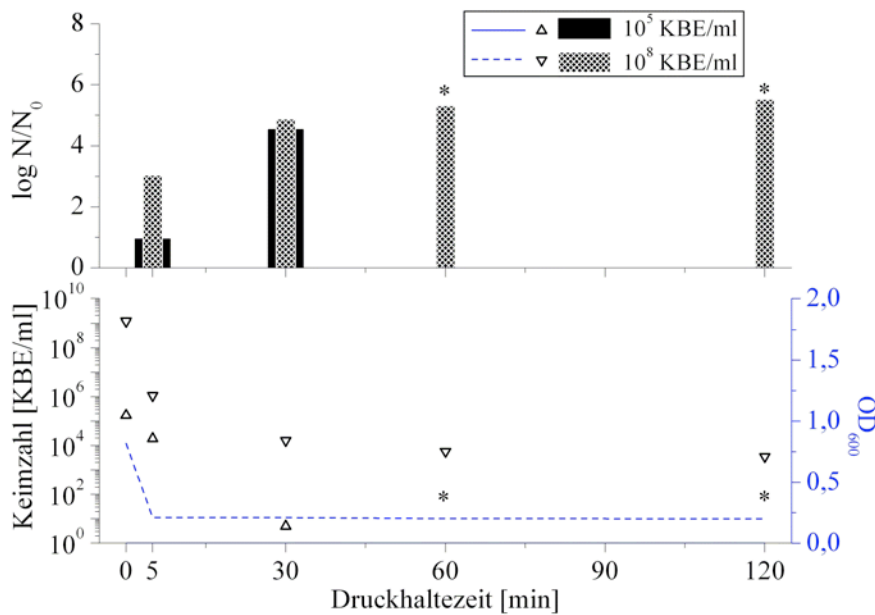


Abb. 88: Keimzahlreduktion von *B. diminuta* Kulturen in Abhängigkeit von der Zelldichte (* keine lebensfähigen Mikroorganismen nachweisbar); Prozessgas: N₂O; Druck: 500 bar; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang: siehe Anhang)

4.3.3 PROZESSGAS STICKSTOFF/DISTICKSTOFFMONOXID

Im Hinblick auf eine spätere Kostenoptimierung des Druckwechselverfahrens wurde die Einsatzmöglichkeit eines binären Gasmisches untersucht. Dazu wurde im Parr-Autoklav zunächst durch Einleitung von Distickstoffoxid ein Druck von 50 bar erzeugt und im Anschluss daran dieser mit Stickstoff auf 500 bar erhöht. Da bei diesem Mischungsverhältnis nur eine einmalige Entnahme möglich war und beide Gase ein gegensätzliches Verhalten beim Einfluss der Druckhaltezeit aufwiesen, wurde die Probe nach einer Druckhaltezeit von 60 min entspannt. Ziel dieses Versuches war es, die guten Lösungseigenschaften des kostenintensiveren Distickstoffoxids mit dem durch die schlechte Löslichkeit bedingten schnellen Druckaufbau des preisgünstigen Stickstoffs zu kombinieren.

Zur Abschätzung der Effektivität des eingesetzten Gasmisches wurde zunächst die Keimabtötung in reiner Distickstoffoxidatmosphäre bei 50 bar und den bisher verwendeten Druckhaltezeiten untersucht. Der Vergleich mit reinem Stickstoff als Prozessgas erfolgte anhand der bereits dargestellten Versuche. Im Ergebnis erwies sich das Gasmisch bei *B. atrophaeus* hinsichtlich der erzielten Reduktionsrate überraschenderweise als deutlich schlechter gegenüber den mit reinem Distickstoffoxid bei 50 bar erzielten Werten (Abb. 89). Auch im Vergleich mit reinem Stickstoff war das Gasmisch weniger effektiv. Die Ursache für dieses unerwartete Ergebnis konnte nicht geklärt werden.

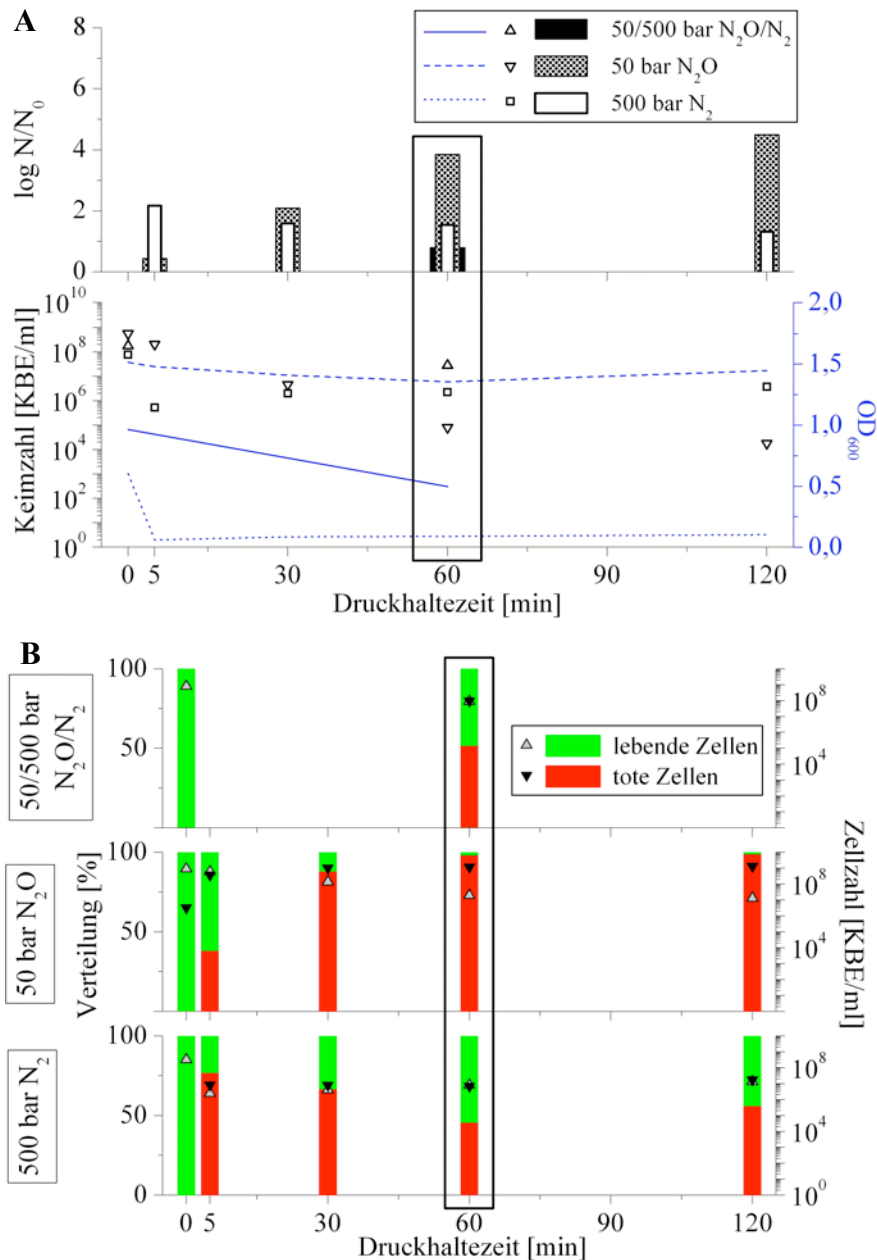


Abb. 89: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei *B. atropheus* Kulturen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Prozessgases; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang; siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung; Die umrahmten Daten heben die für den Vergleich der verschiedenen Gase verwendeten Ergebnisse hervor.

Entgegen den Ergebnissen mit *B. atropheus* war bei den *B. diminuta* Versuchen ein deutlicher Synergismus beim verwendeten Gasmisch zu erkennen (Abb. 90). Die Auswertung der Live/Dead-Färbung ergab für das Gasmisch einen deutlich stärkeren toxischen Einfluss als es bei den Reinsubstanzen der Fall war. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse kann auf Basis der dargestellten Datenlage keine abschließende Bewertung erfolgen. Zur Absicherung der Ergebnisse sind weitere Untersuchungen notwendig. Auch sollte der Einsatz alternativer Gasmische geprüft

werden. So ist aus der Literatur bekannt, dass Helium die Wirksamkeit von Distickstoffoxid erhöht [174].

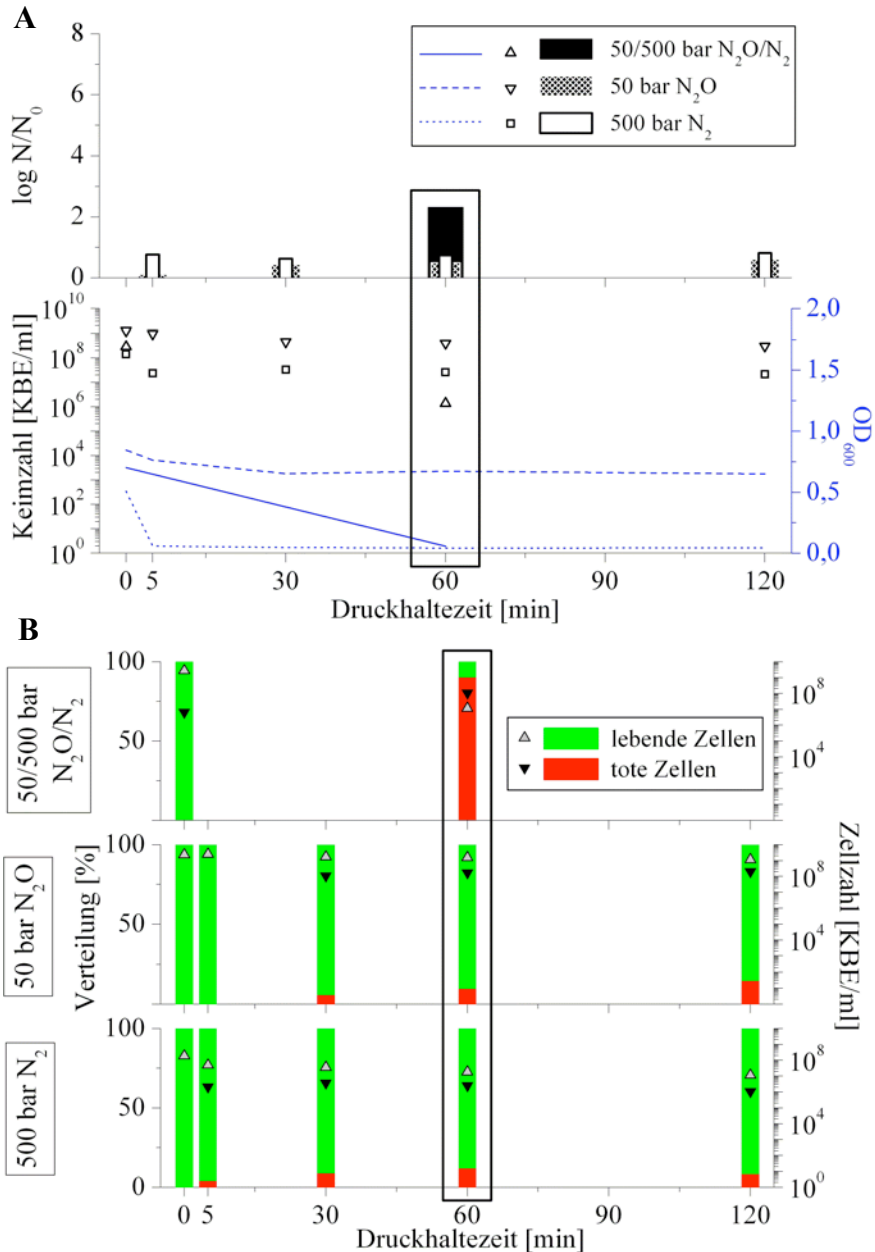


Abb. 90: Durch das Druckwechselverfahren erreichte Keimzahlreduktion bei *B. diminuta* Kulturen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Prozessgases; RT (Druckverlust und Temperaturverlauf je Entspannungsvorgang; siehe Anhang); A: Darstellung der Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B: qualitative und quantitative Auswertung der Live/Dead-Färbung; Die umrahmten Daten heben die für den Vergleich der verschiedenen Gase verwendeten Ergebnisse hervor.

4.3.4 REM-UNTERSUCHUNGEN DRUCKWECHSELBEHANDELTEN MIKROORGANISMEN

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden 1 bzw. 2 ml der jeweiligen druckwechselbehandelten Probe entnommen, in 10 ml isotoner Kochsalzlösung dispergiert und durch einen Nucleopore®-Filter mit einer nominalen Porenweite von

0,22 µm filtriert. Im Anschluss erfolgte nach Trocknung der Proben die Graphit-Bedampfung im Hochvakuum.

4.3.4.1 *BACILLUS ATROPHEUS*

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten sehr deutlich, dass es durch die Druckwechselbehandlung mit Stickstoff zu einer Zerstörung der Bakterienhülle kam. Im Vergleich zur unbehandelten Probe waren nach der Entspannung viele leere Hüllen (Abb. 91 C, weiße Pfeile) bzw. Teile davon im mikroskopischen Bild erkennbar.

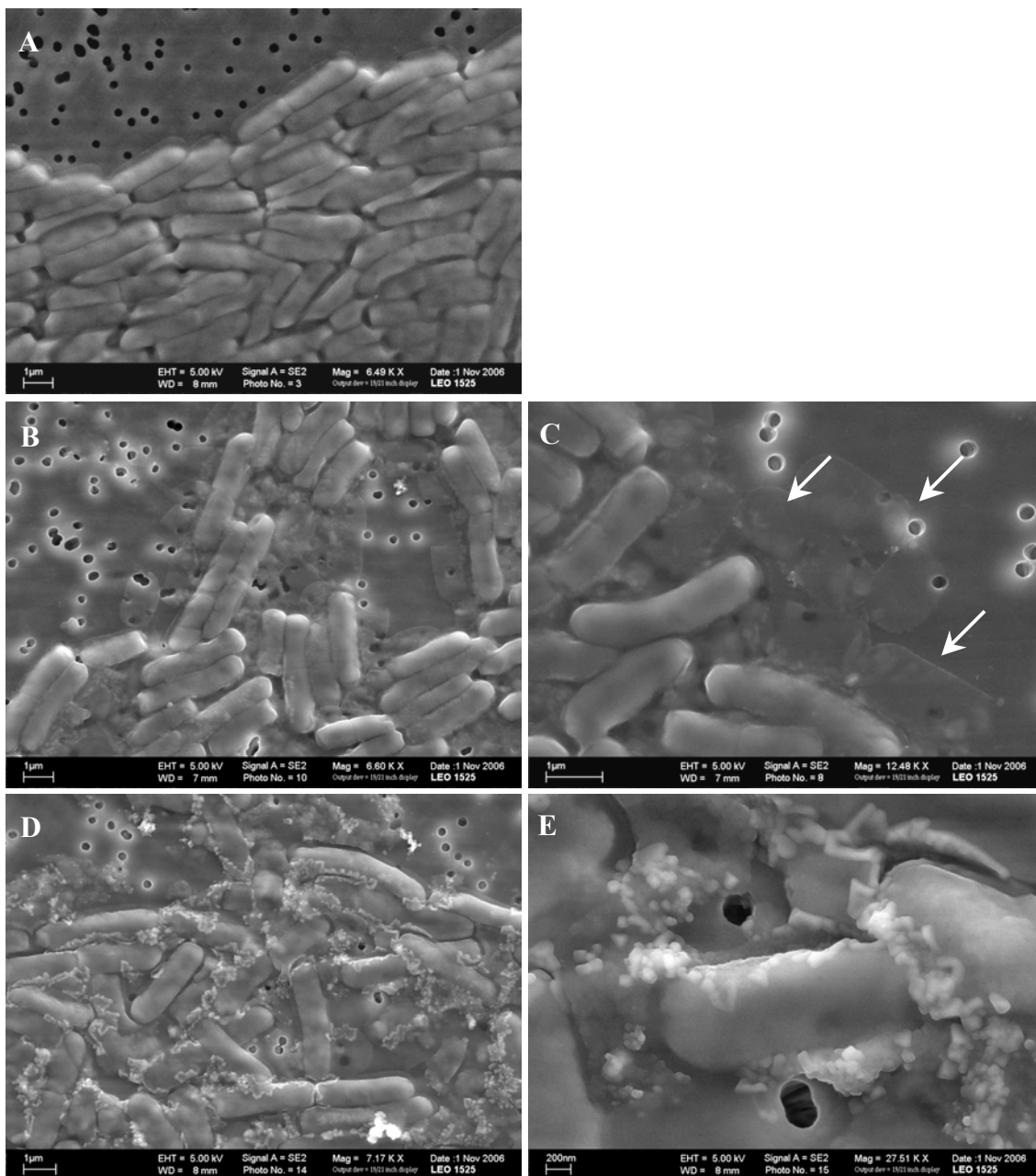


Abb. 91: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *B. atropheus*; A: unbehandelte Probe; B und C: nach dem Druckwechselverfahren mit N₂ bei 500 bar, 30 min, log N/N₀ = 0,39; D und E: nach dem Druckwechselverfahren mit N₂O bei 500 bar, 30 min, log N/N₀ = 3,16

Die äußerlich noch intakten Zellen wiesen keine Veränderungen gegenüber den Zellen der unbehandelten Probe auf. Anders stellte sich das Bild nach der Druckwechselbehandlung mit Distickstoffoxid dar. Hier waren, entsprechend den bereits dargestellten Ergebnissen mit Distickstoffoxid, keine leeren Hüllen zu erkennen. Jedoch wiesen die in ihrer Form intakten Zellen deutliche Ablagerungen auf. Als Ursache hierfür sind ausgetretene Zellbestandteile oder durch das Gas extrahierte Zellwand- oder Zellmembranbestandteile denkbar.

4.3.4.2 *BREVUNDIMONAS DIMINUTA*

Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die *B. diminuta* Zellen, wie die folgenden Aufnahmen zeigen (Abb. 92). Die sich in der unbehandelten Probe noch vom Filter abhebenden Zellen stellten nach der Druckwechselbehandlung mit Stickstoff nur noch eine flache Schicht auf dem Filter dar (Abb. 92 B und C).

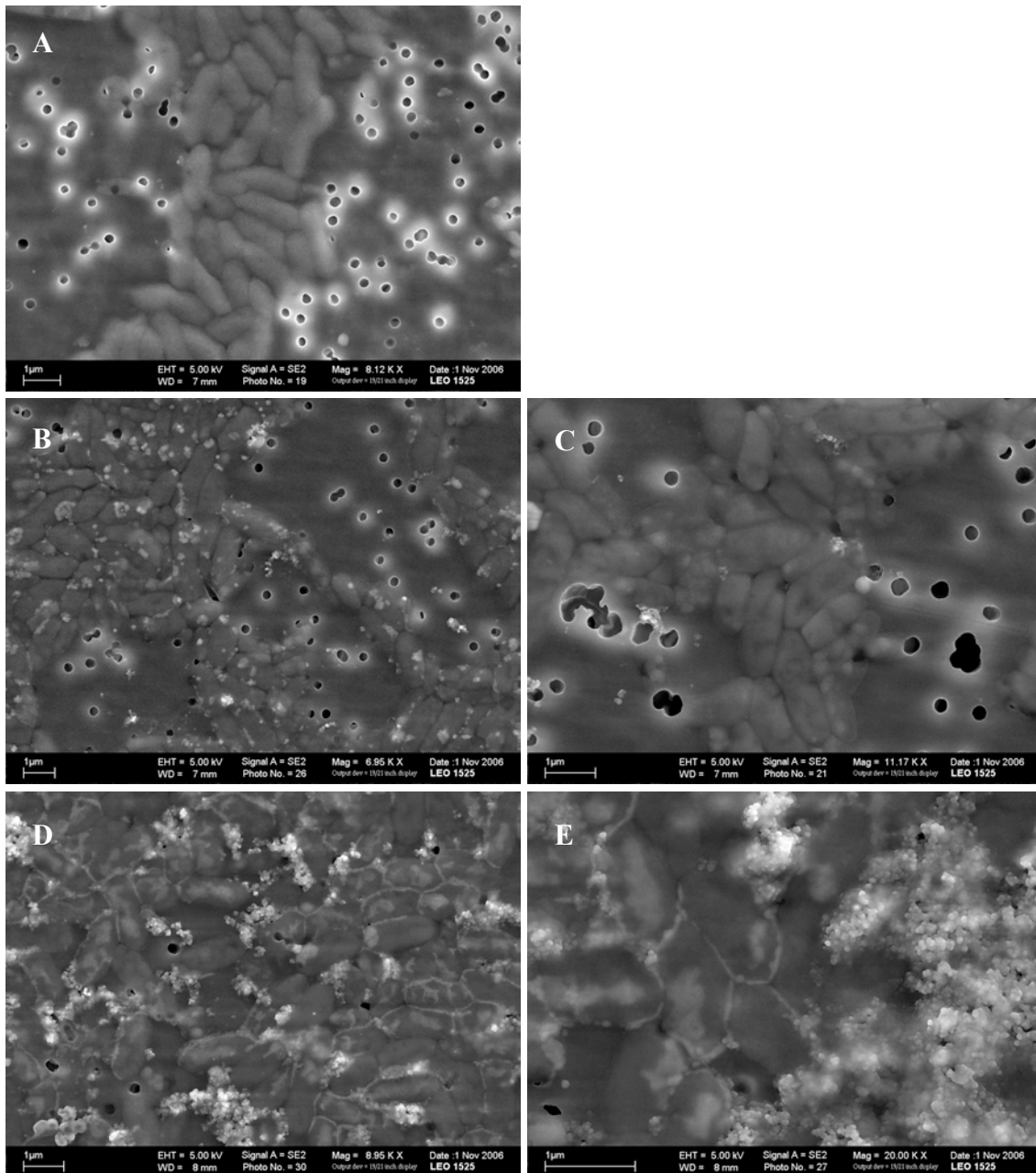


Abb. 92: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *B. diminuta*; A: unbehandelte Probe; B und C: nach dem Druckwechselverfahren mit N₂ bei 500 bar, 30 min, log N/N₀ = 1,23; D und E: nach dem Druckwechselverfahren mit N₂O bei 500 bar, 30 min, log N/N₀ = 2,70;

Darüber hinaus entsteht der Eindruck, als wären Zellbestandteile über die gesamte Fläche verteilt gewesen. Besonders deutlich war dieser Effekt bei den mit Distickstoffoxid behandelten Proben in Form von voluminösen Gebilden zu erkennen (Abb. 92 D und E).

Des Weiteren wiesen die mit Distickstoffoxid behandelten Proben deutlich erkennbare helle Zonen auf, die eventuell auf zerstörte innere Zellstrukturen hinweisen. Auch ist eine partielle Ablösung der Zellmembran von der Zellwand denkbar.

4.3.4.3 *CANDIDA ALBICANS*

Die in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen abgebildeten Zellen wiesen die für Hefen typischen Knospungsstellen auf. Darüber hinaus war bei einigen Zellen von *C. albicans* eine Schutzhülle unbekannter Herkunft zu erkennen (Abb. 93).

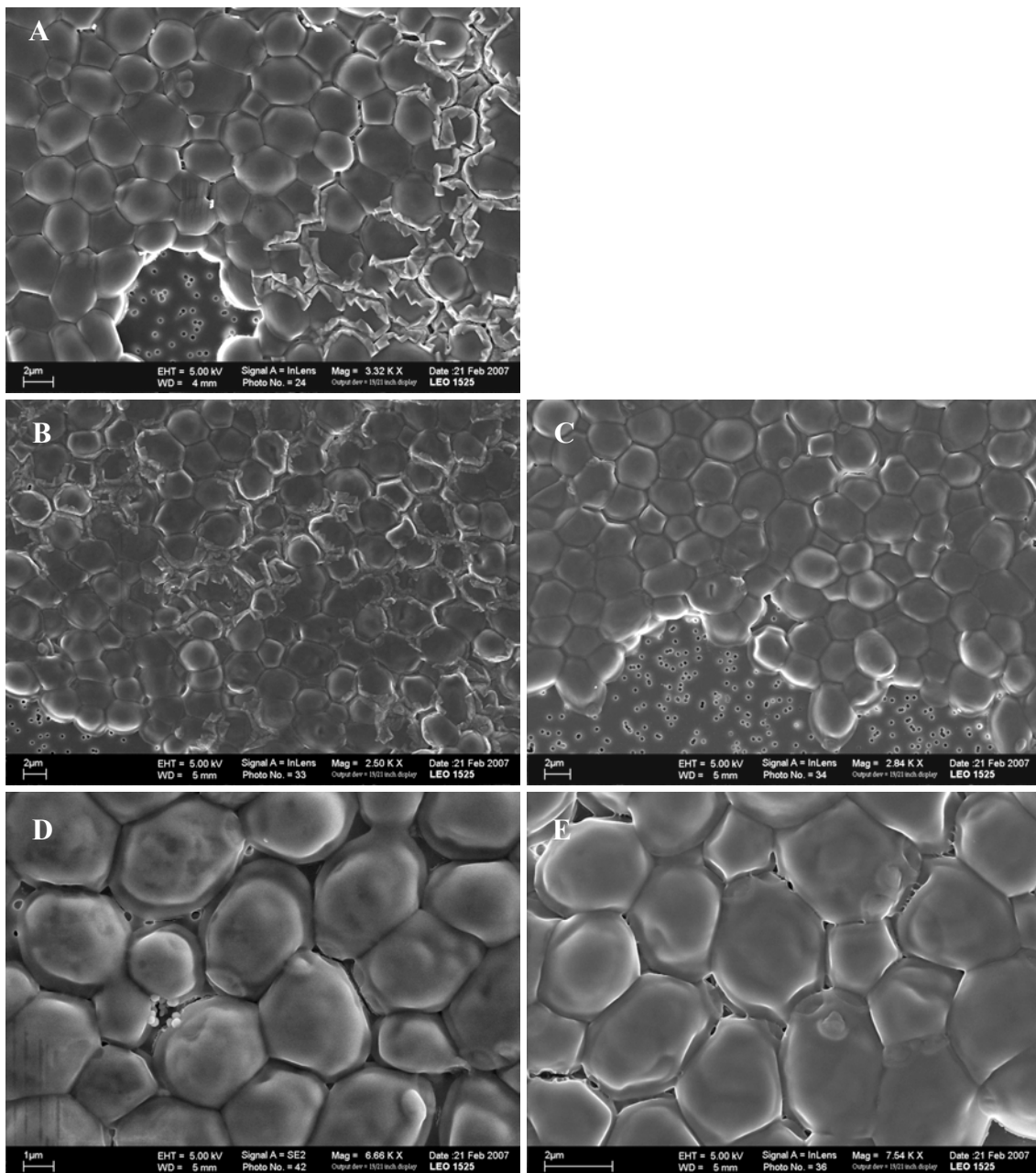


Abb. 93: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. albicans*; A: unbehandelte Probe; B und C: nach dem Druckwechselverfahren mit N₂ bei 500 bar, 30 min, log N/N₀ = 0,02; D und E: nach dem Druckwechselverfahren mit N₂O bei 500 bar, 30 min, log N/N₀ = 1,75

Diese Ablagerungen könnten ein Grund für die schlechten Reduktionsergebnisse bei der Stickstoffbehandlung sein, da auch die mit Stickstoff druckwechselautoklavierten Zellen in vielen Fällen noch diese Hülle aufweisen (Abb. 93 B). Interessant ist, dass die Zellen, besonders nach der Distickstoffoxid-Behandlung, wie zusammengeschweißt erscheinen (Abb. 93 D und E). Eventuell kommt es aufgrund dieser Zusammenlagerung zu einem gegenseitigen Schutzeffekt der Zellen. Aber auch hier ist, wie bei den anderen Proben bereits beobachtet, ein teilweises Austreten von Zellinhalt zu erkennen. Die besonders deutlich nach der Distickstoffoxid-Behandlung auftretenden Unregelmäßigkeiten in der Zelloberfläche und die insgesamt stärkere Konturierung der Zellen wurde bereits bei Kohlendioxidversuchen an *S. cerevisiae* beobachtet [121].

4.3.4.4 REINES NÄHRMEDIUM

Zur Abklärung der Ablagerungen auf den Zelloberflächen wurde reines Nährmedium ebenfalls dem Druckwechselprozess mit Stickstoff und Distickstoffoxid unterworfen. Jedoch konnten nur sehr vereinzelt ähnliche Strukturen wie auf den Mikroorganismenzellen beobachtet werden. Somit stellen die Ablagerungen keine infolge des Druckwechselprozesses ausgefallenen Bestandteile des Nährmediums dar (Abb. 94).

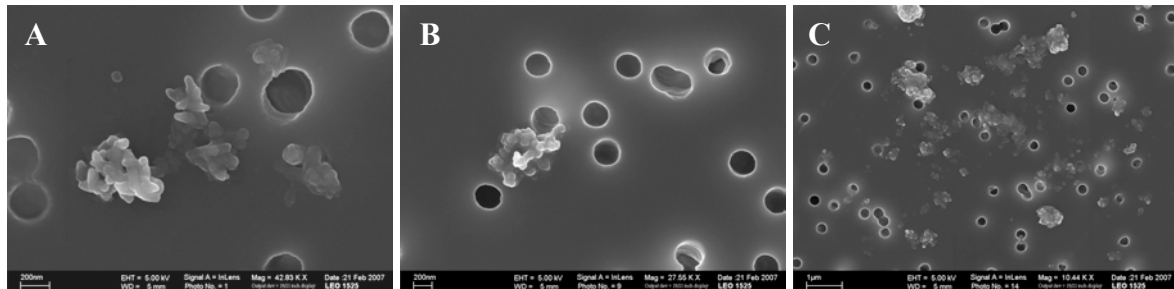


Abb. 94: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des reinen Nährmediums; A: unbehandelte Probe; B: nach dem Druckwechselverfahren mit N_2 bei 500 bar, 30 min; C: nach dem Druckwechselverfahren mit N_2O bei 500 bar, 30 min

4.3.5 DSC-UNTERSUCHUNGEN DRUCKWECHSELBEHANDELTEN MIKROORGANISMEN

In Ergänzung zu den bereits in Kap. 2.3.3 dargestellten DSC-Untersuchungen an unbehandelten Mikroorganismenkulturen, wurde der Einfluss des Druckwechselverfahrens auf die Denaturierungstemperaturen der 70-S Ribosomen und deren Untereinheiten bei *B. diminuta* untersucht. Die Flüssigkulturen wurden dafür dem Druckwechselverfahren bei 500 bar und Raumtemperatur unterworfen. Als Prozessgase kamen Stickstoff und Distickstoffoxid zum Einsatz. Die Probenahmen erfolgten, wie bei den vorangegangenen Versuchen, direkt vor der Druckbeaufschlagung sowie nach 5, 30, 60 und 120 min Druckhaltezeit. Wie bereits in früheren Versuchen beobachtet, führte die Verwendung von

Stickstoff als Prozessgas im Vergleich zu Distickstoffoxid zu einer deutlich geringeren Keimabtötung. Die Bestimmung der Lebendkeimzahlen ergab im Mittel eine Verringerung um eine Zehnerpotenz während die Keimbelastung durch Distickstoffoxid-Behandlung um ca. fünf Zehnerpotenzen gesenkt werden konnte (Abb. 95 A).

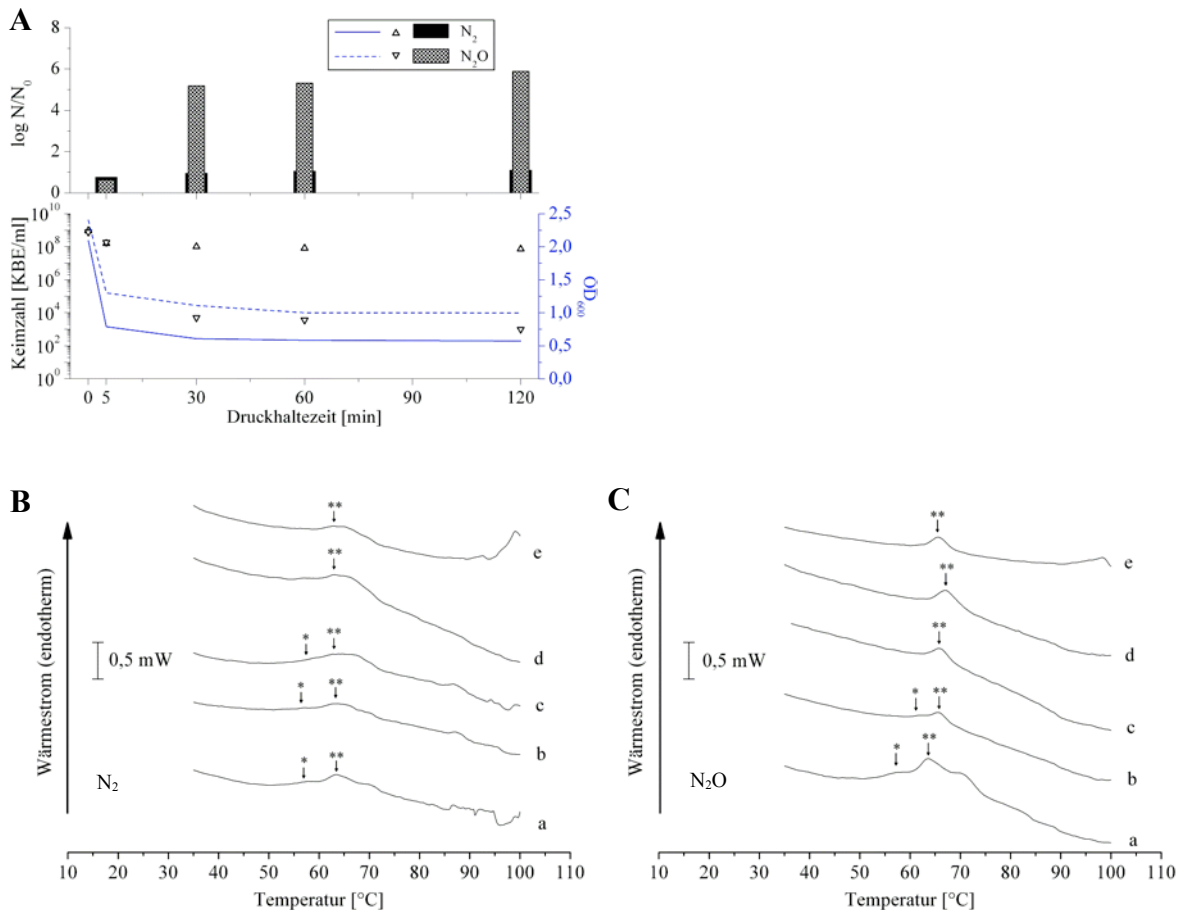


Abb. 95: Ergebnisse der DSC-Untersuchungen an druckwechselbehandelten *B. diminuta* Kulturen (Druck: 500 bar, RT); A: Darstellung der erreichten Keimzahlreduktion anhand der Ergebnisse des Spatelplattenverfahrens und der optischen Dichte; B, C: DSC-Thermogramme; Aufheizrate: 10°C/min

Die Auswertung der in Abb. 95 B und C dargestellten Thermogramme ergab für die mit Stickstoff druckwechselautoklavierte *B. diminuta* Kultur keine Veränderung der Denaturierungstemperatur für die 70-S Ribosomen bzw. deren 50-S Untereinheit (Peak**). Jedoch war eine Verringerung und im weiteren Versuchsverlauf eine vollständige Elimination des Denaturierungspeaks der 30-S Untereinheit (Peak*) zu beobachten. Ursache dafür kann eine Denaturierung der 30-S Untereinheit bereits während des Druckwechselverfahrens infolge der Druck- und Gaseinwirkung sein. Weiterhin ist eine Separierung der 30-S Untereinheit während der Probenpräparation denkbar, da 90 % der Zellen zerplatzten und somit der Zellinhalt einschließlich der darin befindlichen Ribosomen an das umgebende Medium abgegeben wurde. Da die für die Probenpräparation gewählten Bedingungen für eine Sedimentation der Ribosomen nicht ausreichten, könnten diese

Ribosomen mit dem Überstand verworfen worden sein. Dagegen spricht jedoch das Vorhandensein des Denaturierungspeaks für die 70-S Ribosomen, weil diese ebenfalls beim Zerplatzen an das umliegende Medium abgegeben worden und auch für deren Sedimentation die Bedingungen nicht ausreichend gewesen wären. Somit ist eine Denaturierung der 30-S Untereinheiten wahrscheinlicher als deren Nichterfassung durch eine unzureichende Trennung während der Probenaufbereitung. Darüber hinaus war keine weitere Veränderung der Thermogramme im Temperaturbereich von 40-80°C erkennbar. Es ist jedoch festzustellen, dass die Thermogramme der 120 min-Proben einen deutlichen Peak im Bereich von 95-100°C aufwiesen, welcher bei den unbehandelten Proben bzw. den Proben mit geringerer Kontaktzeit nicht vorhanden war. Hierfür kann eine Verringerung der Denaturierungstemperatur der zellulären DNA bzw. eine zu geringeren Temperaturen hin verschobene, thermische Zersetzung verschiedener Zellwandbestandteile ursächlich sein. Die Thermogramme der mit Distickstoffoxid behandelten Proben wiesen ebenfalls eine Verringerung bzw. bei fortschreitender Druckhaltezeit die vollständige Elimination des 30-S Denaturierungspeaks auf. Darüber hinaus kam es bereits nach einer Prozesszeit von 5 min zu einer Verschiebung der Denaturierungstemperaturen zu höheren Werten. Die in Tab. 16 und 17 dargestellten Onset-Temperaturen in Abhängigkeit von der Druckhaltezeit verdeutlichen dies.

Tab. 16: Onset-Temperaturen der betrachteten Phasenübergänge bei Verwendung von Stickstoff als Prozessgas für das Druckwechselverfahren

Peak *	0-Probe (a)	5 min (b)	30 min (c)	60 min (d)	120 min (e)
Probe 1	55,84	55,68	-	-	-
Probe 2	55,77	55,63	-	-	-
Probe 3	54,40	59,56	56,07	55,39	-
\bar{x}	55,34	56,96	-	-	-
s	0,81	2,25	-	-	-
s _{rel}	1,47	3,96	-	-	-

Peak **	0-Probe (a)	5 min (b)	30 min (c)	60 min (d)	120 min (e)
Probe 1	60,71	60,02	56,15	63,63	62,78
Probe 2	61,60	59,88	59,92	58,07	60,31
Probe 3	60,70	59,56	60,52	60,67	58,01
\bar{x}	61,00	59,82	58,86	60,79	60,37
s	0,52	0,24	2,37	2,78	2,39
s _{rel}	0,85	0,39	4,02	4,58	3,95

Unter dem Einfluss von Distickstoffoxid war somit neben der Denaturierung der 30-S Untereinheiten auch eine Veränderung der übrigen ribosomalen Proteine zu verzeichnen. Eine druckinduzierte Veränderung der quartären Proteinstruktur, wie vielfach beschrieben

[176, 177], konnte dabei jedoch ausgeschlossen werden, da die stickstoffbehandelten Proben dieses Verhalten bei gleichem Prozessdruck nicht aufwiesen.

Tab. 17: Onset-Temperaturen der betrachteten Phasenübergänge bei Verwendung von Distickstoffoxid als Prozessgas für das Druckwechselverfahren

Peak *	0-Probe (a)	5 min (b)	30 min (c)	60 min (d)	120 min (e)
Probe 1	53,77	61,64	-	-	-
Probe 2	54,84	60,81	61,23	-	-
Probe 3	51,02	62,41	-	-	-
\bar{x}	53,21	61,62	-	-	-
s	1,97	0,80	-	-	-
s_{rel}	3,70	1,30	-	-	-

Peak **	0-Probe (a)	5 min (b)	30 min (c)	60 min (d)	120 min (e)
Probe 1	60,74	64,13	62,90	62,90	63,45
Probe 2	61,04	63,91	63,84	62,33	62,24
Probe 3	59,57	64,58	62,70	63,48	62,46
\bar{x}	60,45	64,21	63,15	62,90	62,72
s	0,78	0,34	0,61	0,58	0,64
s_{rel}	1,28	0,53	0,96	0,91	1,03

Trotz des zeitlich versetzten Anstiegs der Denaturierungstemperaturen nach 5 min (Abb. 96) und der Zellinaktivierung nach 30 min (Abb. 95 A) unter Verwendung von Distickstoffoxid als Prozessgas ist ein direkter Zusammenhang dieser beiden Beobachtungen denkbar. Es wird angenommen, dass sich der Einfluss einer gestörten Proteinbiosynthese auf die Lebensfähigkeit der Bakterienzellen erst mit einer zeitlichen Verzögerung in Form des Zelltods manifestiert. Dabei ist das zeitliche Ausmaß dieser Verzögerung von verschiedenen noch unbekanntem äußeren und inneren Faktoren abhängig. Ein Beleg dafür ist auch die je nach Mikroorganismenspezies unterschiedlich lange Druckhaltezeit bis zum Erreichen der maximalen Reduktionsrate trotz gleicher Lösungsgeschwindigkeiten (vgl. Kap. 4.3.2)

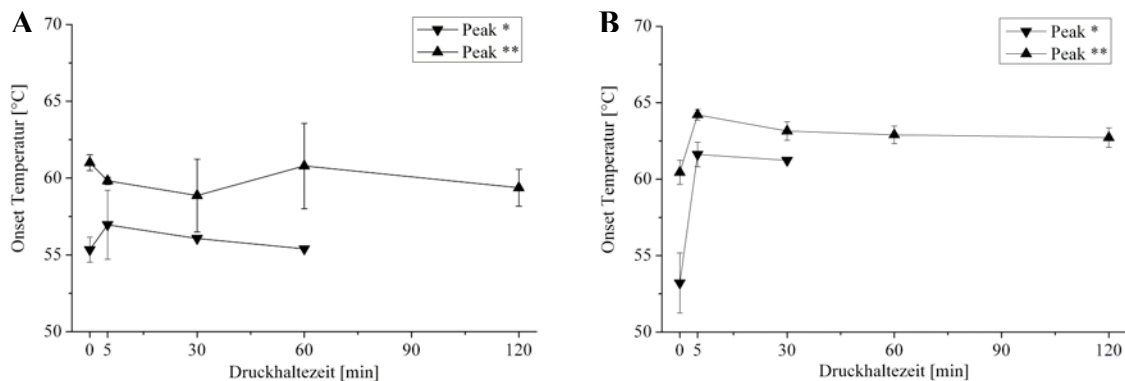


Abb. 96: Darstellung der Onset-Temperaturen in Abhängigkeit von der Druckhaltezeit; A: unter Verwendung von N₂ als Prozessgas; B: unter Verwendung von N₂O als Prozessgas ($\bar{x} \pm s$; n=3)

In Ergänzung zu den hier dargestellten Ergebnissen konnte Spilimbergo et al. bei Druckversuchen mit Kohlendioxid eine druckabhängige Schmelzpunktdepression verschiedener Lipide (Tristearin, Phosphatidylcholin) nachweisen [178]. Diese Ergebnisse lassen ein ähnliches Verhalten der membranär vorhandenen Phospholipide erwarten und unterstützen die Annahme, dass mit der Druckwechselbehandlung eine Fluidisierung der Bakterienmembranen stattfindet.

5 WIRKSTOFFSTABILITÄT

5.1 EINLEITUNG

Anhand von Stabilitätsuntersuchungen mit verschiedenen hydrolyse-, oxidations- bzw. druckempfindlichen Modellarzneistoffen sollte der Einfluss des Druckwechselverfahrens auf zu entkeimende Arzneistofflösungen untersucht werden. Aus verfahrenstechnischer Sicht war darüber hinaus die Klärung der Frage – ob die durch den Gaseintrag zugeführte Wärme im System verbleiben kann, oder eine Abführung dieser Wärme aus dem System aus Stabilitätsgründen zwingend notwendig ist – von besonderem Interesse. Auf den Ergebnissen der Kurzzeitstabilitäten aufbauend sollte außerdem anhand von Probechargen eines Arzneimittels, welche mit dem Druckwechselverfahren behandelt worden sind, die Langzeitstabilität nachgewiesen werden.

Als Modellsubstanzen wurden thermolabile Wirkstoffe gewählt, die hauptsächlich in Form von sterilen Lösungen als Augentropfen bzw. als Injektions- oder Infusionslösung therapeutische Anwendung finden. Mit Ausnahme des Humaninsulins handelte es sich dabei um Verbindungen mit einzelnen überschaubaren funktionellen Gruppen, die für die in Betracht kommenden chemischen Reaktionen, Hydrolyse und Oxidation, prädestiniert sind (L-Epinephrin, D-Penicillamin, Physostigmin und Paraoxon).

Parallel zu den Druckwechselversuchen wurden die betrachteten Arzneistoffzubereitungen einer Sterilisation mit den konventionellen Sterilisationsmethoden des Arzneibuches (Hitzesterilisation mit gespanntem Wasserdampf, Filtration durch bakterienzurückhaltende Filter) unterworfen. Die erhaltenen Ergebnisse dienen mit als Bewertungsgrundlage für die Effizienz des Druckwechselverfahrens.

5.1.1 L-EPINEPHRIN (ADRENALIN)

L-Epinephrin ist ein körpereigener Neurotransmitter des vegetativen Nervensystems. Als Sympathomimetikum findet es unter anderem Anwendung zur Behandlung anaphylaktischer Schockzustände, zur Akuttherapie des Asthma bronchiale und als Notfallmedikament bei akutem Herzstillstand [179]. Die übliche Konzentration wässriger L-Epinephrin-Zubereitungen liegt zwischen 1 und 10 mg/ml [180]. Die freie Base ist ein weißes bis schwach bräunlich-weißes, kristallines Pulver von bitterem Geschmack und ohne Geruch. Die Substanz ist trotz der vier hydrophilen funktionellen Gruppen (Abb. 97) in Wasser nahezu unlöslich. Im festen und gelösten Zustand ist die freie Base instabil. L-Epinephrin-Lösungen werden durch Licht, Luftsauerstoff und andere Oxidationsmittel

zersetzt. Abbaureaktionen und Racemisierung sind pH- und temperaturabhängig. Das Stabilitätsoptimum liegt zwischen pH 3,0 und pH 3,8; wässrige Lösungen ab pH 5,5 sind instabil [180]. Die Stabilisierung wässriger L-Epinephrin-Zubereitungen erfolgt üblicherweise durch einen 0,1 %igen Natriumdisulfit-Zusatz (Antioxidans). Aufgrund der bereits genannten schlechten Lösungseigenschaften der freien L-Epinephrin-Base findet nur das Salz therapeutische Anwendung (Hydrochlorid, Hydrogentartrat).

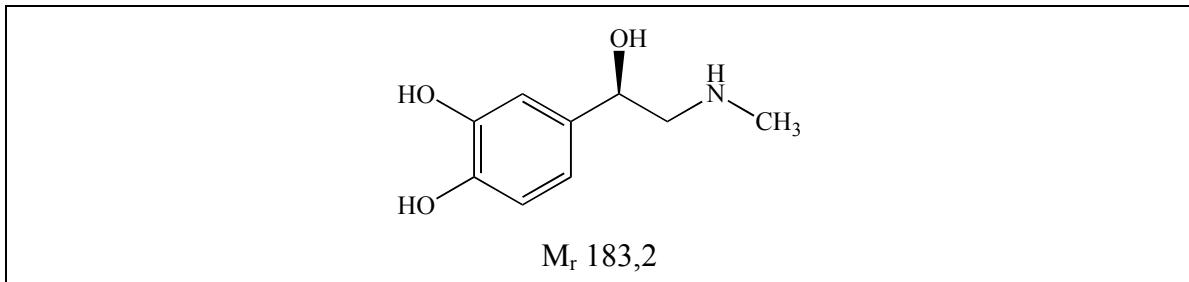


Abb. 97: Strukturformel von L-Epinephrin

Die Strukturen der meisten Abbauprodukte des L-Epinephrins sind bekannt. Das oxidationsempfindliche Brenzkatechinderivat wird in wässriger neutraler oder alkalischer Lösung in der Wärme unter Rotfärbung über die Adrenochrom-Oxidation zu Adrenochrom (Abb. 98), Oxadrenochrom und Adrenolutin abgebaut. Tageslicht und Schwermetalle beschleunigen die Reaktion [181].

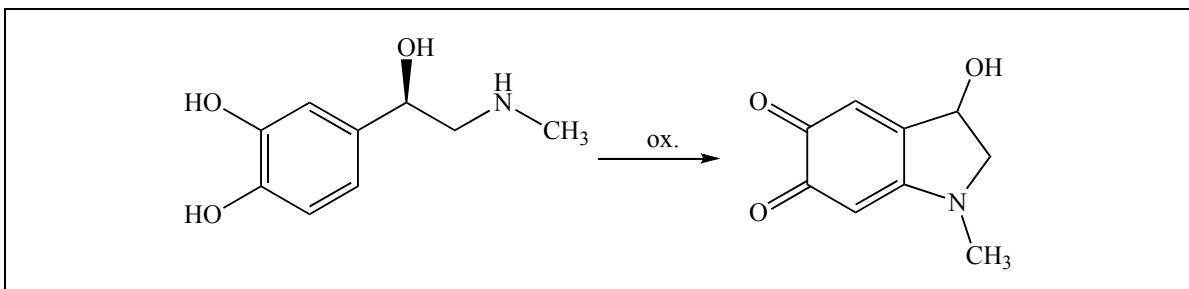


Abb. 98: Adrenochrombildung

Aus den Oxidationsprodukten des L-Epinephrins können zudem polymere Strukturen entstehen, die als Epinephrin-Schwarz bezeichnet werden. Als Syntheseverunreinigung kann Adrenalon auftreten [182].

Die Lagerfähigkeit von L-Epinephrin-Lösungen ist stark vom Behältnis abhängig; Kunststoffe sind geeigneter als Braunglas. L-Epinephrin-Zubereitungen sind lichtgeschützt in evakuierten oder luftdicht verschlossenen oder in mit indifferentem Schutzgas gefüllten Gefäßen aufzubewahren. Die Sterilisation erfolgt üblicherweise im Endbehältnis mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf bei 121°C, 2 bar und einer Einwirkzeit von 15 min [181].

5.1.2 D-PENICILLAMIN

D-Penicillamin (Abb. 99) ist eine nicht-proteinogene α -Aminosäure und als Abbauprodukt des Penicillins bereits lange bekannt. Ursprünglich diente die Substanz als Antidot bei Schwermetallvergiftungen (Chelatbildung). Therapeutisch wird sie des Weiteren bei Morbus Wilson (Kupferspeicherkrankheit) eingesetzt. Die später entdeckte inaktivierende Wirkung auf verschiedene Rheumafaktoren (Makroglobuline) und die Hemmung der Bindegewebsproliferation führten zur Anwendung bei rheumatoider Arthritis. Aufgrund zum Teil schwerer Nebenwirkungen (Nierenschäden, Veränderung des Blutbildes) besitzt die Substanz allerdings nur noch als Reservestoff Bedeutung [183]. Ein neues Therapiegebiet könnte die Behandlung der neurodegenerativen Krankheiten Alzheimer und Parkinson sein. Es ist bekannt, dass Schwermetall-Ionen bei diesen Erkrankungen maßgeblich am Krankheitsverlauf beteiligt sind. Gelingt es, durch entsprechende Formulierungen (z.B. Nanopartikel) die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, könnte D-Penicillamin die Konzentration der Schwermetall-Ionen im Gehirn senken und dadurch den Krankheitsverlauf verlangsamen [184].

Die Reinsubstanz ist ein weißes bis fast weißes, kristallines, leicht wasserlösliches Pulver. Sie besitzt einen für schwefelhaltige Aminosäuren typischen Eigengeruch und schmeckt leicht bitter. In kristalliner Form und in Lösungen niedriger pH-Werte (pH 2-4) ist D-Penicillamin stabiler als in Lösungen höherer pH-Werte.

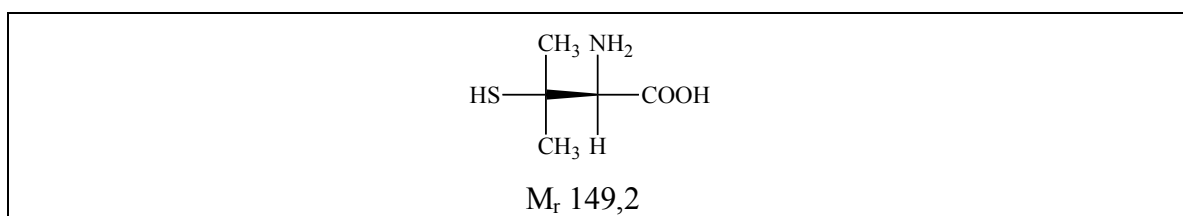


Abb. 99: Strukturformel von D-Penicillamin

Durch längere Einwirkung von Luftsauerstoff oder bei Kontakt mit schwachen Oxidationsmitteln wird D-Penicillamin oxidativ durch Bildung eines Disulfids abgebaut (Abb. 100) [185]. Penicillamindisulfid ist ebenfalls eine weiße Substanz. Die Bildung des Disulfids tritt auch während der Verarbeitung der Substanz auf. Die Lagerung muss luftdicht erfolgen.

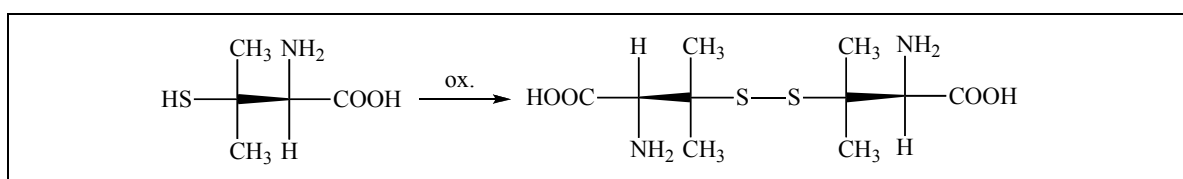


Abb. 100: Dimerisierung von D-Penicillamin

Als Sterilisationsmethode für wässrige D-Penicillamin-Lösungen wird die Sterilfiltration durch bakterienzurückhaltende Filter mit einer nominalen Porenweite von 0,22 µm empfohlen [181].

5.1.3 PHYSOSTIGMIN (ESERIN)

Physostigmin (Abb. 101) ist das Hauptalkaloid der Kalabarbohne. Durch kompetitive Hemmung der Acetylcholinesterase verhindert es den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin und wirkt dadurch indirekt parasymphomimetisch. Der damit einhergehende pharmakodynamische Effekt der Miosis wurde in der Vergangenheit in der Glaukom-Therapie genutzt. Heute besitzt Physostigmin nur noch als Antidot bei Vergiftungen mit Parasympatholytika (m-Cholinozeptor-Antagonisten), wie z.B. Atropin, Bedeutung.

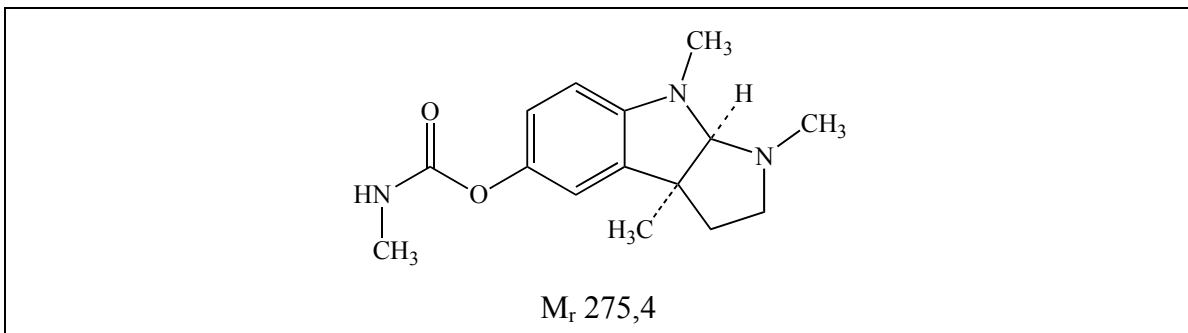


Abb. 101: Strukturformel von Physostigmin

Physostigmin ist ein weißes, geruchloses, kristallines, in Wasser schwer lösliches Pulver. Bei Erwärmung, Licht- und/oder Luftenwirkung und Kontakt mit Metall tritt Rotfärbung auf. Der Carbaminsäureester zersetzt sich temperaturabhängig in basischem Milieu hydrolytisch und oxidativ. Die Hydrolyse von Physostigmin unter Abspaltung von Methylamin und Kohlendioxid ergibt Eserolin, welches leicht zum rot gefärbten Rubreserin oxidiert wird. Weitere Zersetzung führt zu Eserinblau und Eserinbraun. Physostigmin soll in gut gefüllten, dicht verschlossenen, vor Licht geschützten Glasbehältnissen aufbewahrt werden. Für die Sterilisation wässriger Physostigmin-Lösungen empfiehlt das DAC/NRF 2004 die Sterilfiltration in sterile Endbehältnisse.

5.1.4 PARAOXON

Paraoxon (Abb. 102) gehört zur Gruppe der Organophosphate. Als irreversibler Cholinesterasehemmer (Phosphorylierung des esteratischen Zentrums) wurde Paraoxon in der Vergangenheit als Miotikum zur Glaukom-Therapie eingesetzt, besitzt aber aufgrund des hohen toxischen Potentials heute keine Bedeutung mehr.

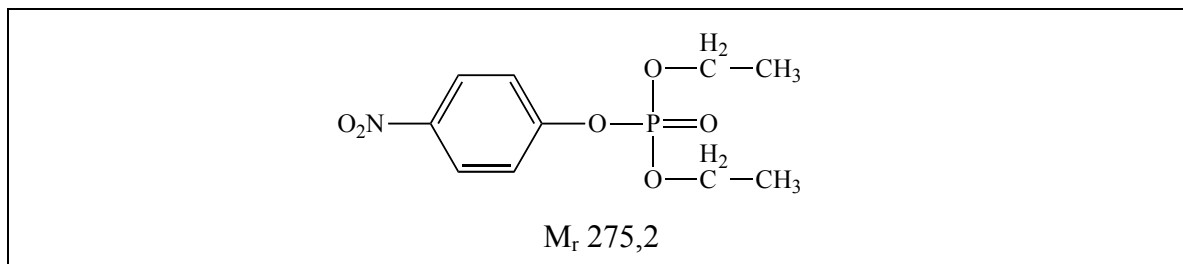


Abb. 102: Strukturformel von Paraoxon

Die Reinsubstanz ist eine gelbe, ölige Flüssigkeit von schwachem Geruch [181]. Die Substanz ist in Wasser sehr schwer löslich. Bei wässrigen Paraoxon-Lösungen mit einem pH-Wert > 7 kommt es verstärkt zur Hydrolyse des Phosphorsäureesters; primäre Abbauprodukte sind p-Nitrophenol und Diethylphosphat [186]. Als Sterilisationsmethoden kommen aufgrund der genannten Hydrolyseempfindlichkeit nur die Sterilfiltration oder die aseptische Herstellung in Betracht.

5.1.5 HUMANINSULIN

Humaninsulin ist ein Polypeptid aus 51 Aminosäuren. Es besteht aus zwei Strängen, der aus 21 Aminosäuren bestehenden A-Kette und der aus 30 Aminosäuren gebildeten B-Kette. Beide Ketten sind über zwei interchenare Disulfid-Brücken miteinander verknüpft (Abb. 103). Eine dritte Disulfid-Brücke ist innerhalb der A-Kette lokalisiert. Die Sekundärstruktur der A-Kette weist zwei α -Helices und die der B-Kette zwei antiparallele β -Stänge und eine α -Helix auf. Eine Spaltung der Disulfid-Brücken durch Oxidation, Reduktion oder Sulfitolyse führt aufgrund der damit einhergehenden Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins zu einem Verlust der biologischen Aktivität. Auch die Einwirkung von Hitze, Druck oder Alkalihydroxiden kann zu einer Entfaltung oder Missfaltung (Denaturierung) des Proteins führen. Ursache hierfür ist der geringe energetische Unterschied zwischen nativ gefalteter und entfalteter Form, resultierend aus nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Die Folgen sind Aktivitätsverlust und die Gefahr einer Aggregation, welche zu amyloiden Insulinablagerungen im Organismus von Diabetes-Patienten führen kann [187, 188]. Die Biosynthese im menschlichen Organismus erfolgt im pankreatischen Gewebe (β -Zellen der Langerhans-Inseln) über zwei Vorläuferproteine (Praeproinsulin und Proinsulin). Insulin reguliert neben Glucagon (Antagonist) den Glucosestoffwechsel im Organismus und muss daher bei einem vorliegenden relativen oder absoluten Mangel substituiert werden. Dies geschieht bis auf wenige Ausnahmen parenteral, wobei die subkutane Applikation bevorzugt wird.

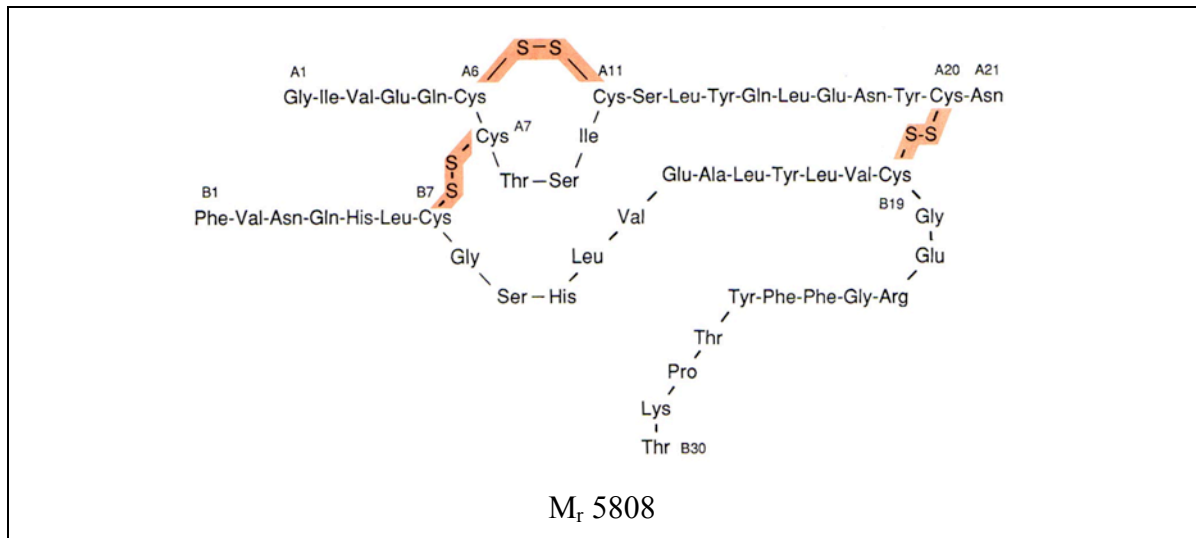


Abb. 103: Primärstruktur des Humaninsulins nach [189]

Insulin ist ein weißes bis fast weißes Pulver und ist praktisch unlöslich in Wasser. Die Substanz löst sich in verdünnten Mineralsäuren und unter Zersetzung in verdünnten Alkalihydroxid-Lösungen. Durch Zusatz von Zn^{2+} -Ionen kristallisiert gelöstes Insulin unter Bildung von Dimeren aus wässrigen Lösungen aus. Dabei assoziieren drei Dimere unter Elimination eines Zink-Kations zu einem Hexameren. Dieser Vorgang ist reversibel; je geringer der pH-Wert der Lösung, desto stärker ist das Gleichgewicht in Richtung der Monomere verschoben. Die native Faltung wird dabei nicht beeinflusst [190]. Jedoch fördern die Bedingungen, welche die Bildung von Monomeren begünstigen, auch die Aggregation und Fibrillierung von Insulin [190]. Der isoelektrische Punkt von Insulin-Monomeren liegt bei pH 5,4. Durch die Komplexbildung mit Zink wird dieser zu höheren pH-Werten verschoben. Insulin ist alkali- und hitzempfindlich; oberhalb pH 11 kommt es zu einer raschen Denaturierung. Gemäß Ph. Eur. entsprechen 0,0347 mg Humaninsulin 1 I.E. Insulin. Die übliche Konzentration wässriger Insulinzubereitungen beträgt je nach Applikationssystem 40 bzw. 100 I.E./ml. Der pH-Wert der Zubereitungen liegt im Allgemeinen zwischen 7,0 und 7,8 [180].

5.2 MATERIALIEN UND METHODEN

5.2.1 MATERIALIEN

5.2.1.1 WIRKSTOFFE

L-Epinephrinhydrogentartrat

Paraoxon

D-Penicillamin

Physostigminsalicylat

Zink-Insulin, human

5.2.1.2 PUFFER

Phosphat-Puffer pH 4,5: 6,8 g Kaliumdihydrogenphosphat R (0,05 mol/l)
in 1.000 ml Wasser R

Phosphat-Puffer pH 7,0: 250 ml Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung. (0,2 mol/l)
148,2 ml Natriumhydroxid-Lösung (0,2 mol/l)
601,8 ml Wasser R
pH-Einstellung mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung

Phosphat-Puffer pH 9,0: 17,4 g Kaliumdihydrogenphosphat (0,13 mol/l)
in 1.000 ml Wasser R
pH-Einstellung mit 1 M Kaliumhydroxid-Lösung

5.2.1.3 STERILFILTRATION

Sterile Polypropylen-Einmalspritzen (Größe 10 ml)

Sterile Einmalkanülen (20G x 1,5“)

Sterilfilter: Minisart® NML (Porengröße 0,22 µm, Celluloseacetat)

5.2.1.4 VERPACKUNGSMATERIAL

ISO-Injektionsflaschen aus Braunglas, 10 ml

Chlorbutylstopfen mit Flurotec®-Folie

Bördelkappen mit Mittelabriss

5.2.2 METHODEN

5.2.2.1 HERSTELLUNG UND BEHANDLUNG DER PROBEN

5.2.2.1.1 KURZZEITSTABILITÄT VON L-EPINEPHRIN, D-PENICILLAMIN, PHYSOSTIGMIN UND PARAOXON

Erste Versuche wurden an wässrigen Wirkstofflösungen durchgeführt, um zunächst grundlegende Abhängigkeiten möglicher chemischer Veränderungen von den verschiedenen Prozessparametern bei den unterschiedlichen konventionellen Sterilisationsverfahren zu untersuchen. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen kamen außerdem Phosphatpufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte zur Anwendung (pH 4,5/7,0/9,0). Sterilisationsverfahren waren die Dampfsterilisation im Endbehältnis mit gespanntem, gesättigtem Wasserdampf (121°C, 2 bar, 15 min) und die Filtration durch bakterienzurückhaltende Filter (Porengröße 0,22 µm). Zur Quantifizierung des Wirkstoffabbaus während der Probenvorbereitung dienten Nullproben, die keiner Sterilisation/Entkeimung unterworfen wurden.

Von allen Arzneistofflösungen wurden jeweils Proben mit und ohne Stickstoffbegasung hergestellt. Nach 15 min Begasung wurden die Zubereitungen in mit Stickstoff vorgespülte und luftdicht verschlossene ISO-Injektionsflaschen abgefüllt. Die oxidationsempfindlichen Substanzen L-Epinephrin, D-Penicillamin und Physostigmin erforderten darüber hinaus die Herstellung einer Sofortprobe direkt vor der Analytik. Auf Grund der geringen Wasserlöslichkeit von L-Epinephrin und Physostigmin kamen die in der Ph. Eur. monographierten, gut wasserlöslichen Salze zum Einsatz. 1 %ige wässrige Paraoxon-Lösungen waren nicht herstellbar, da die Löslichkeit des Paraoxons zu gering ist. Es resultierten lediglich gelb gefärbte Zweiphasensysteme, in denen deutlich einzelne ölige, ungelöste Paraoxontropfen zu erkennen waren (Tab. 18).

Tab. 18: Eigenschaften 1%iger wässriger Wirkstoffzubereitungen

1 %ige wässrige Wirkstoffzubereitung	Eigenschaften
L-Epinephrinhydrogentartrat	klare, farblose, schwebstofffreie Lösung
Paraoxon	gelbe, schwebstofffreie Emulsion; einzelne Substanztropfen sichtbar
D-Penicillamin	klare, farblose, schwebstofffreie Lösung
Physostigminhemisalicylat	klare, farblose, schwebstofffreie Lösung

Nach Vorversuchen zur Löslichkeit wurde die Konzentration des Wirkstoffes Paraoxon auf 0,005 % reduziert. Bei dieser Konzentration lag der Wirkstoff vollständig gelöst vor. Die hergestellten Lösungen wurden vor der HPLC-Analytik visuell beurteilt und deren pH-Werte bestimmt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Wirkung des Druckwechselferfahrens unter Variation der Parameter Einwirkzeit, Prozesstemperatur und pH-Wert der Lösung auf die chemische Stabilität der Wirkstoffe L-Epinephrinhydrogentartrat, D-Penicillamin, Physostigminhemisalicylat und Paraoxon untersucht (Tab. 19).

Tab. 19: Druckwechselferklavierte Zubereitungen

Arzneistoff	Konzentration [%]	Stickstoff-Begasung	pH
L-Epinephrinhydrogentartrat	1,0	Ja	4,5/ 7,0/ 9,0/ dest. Wasser pH 6,8
D-Penicillamin	0,005	Ja	4,5/ 7,0/ 9,0/ dest. Wasser pH 6,8
Physostigminsalicylat	1,0	Ja	4,5/ 7,0/ 9,0/ dest. Wasser pH 6,8
Paraoxon	1,0	Nein	4,5/ 7,0/ 9,0/ dest. Wasser pH 6,8

Die Herstellung der Arzneistofflösungen (60 ml) erfolgte in 250 ml-Borosilikat-Laborflaschen und mit einer Ausnahme immer unter Stickstoffbegasung. Bei der Herstellung der oxidations-unempfindlichen Paraoxon-Proben wurde auf die Stickstoffbegasung verzichtet. Im Anschluss wurden die Proben unter Ausschluss von Luftsauerstoff in den Druckwechselferklaven (Premex) überführt und für 1 h bei 500 bar/20°C autoklaviert. Danach erfolgte die erste Probenahme durch Teilentspannung in eine 100 ml-Borosilikat-Laborflasche (Abb. 104).

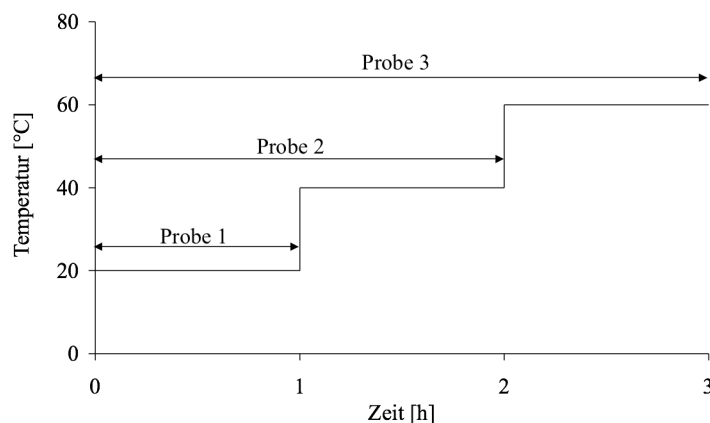


Abb. 104: Versuchsbedingungen für das Druckwechselferfahren (Probenahmen vor und nach der initialen Druckbeaufschlagung nicht dargestellt)

Im weiteren Versuchsverlauf wurde die Temperatur in zwei Stufen im Abstand von einer Stunde um jeweils 20°C erhöht. Am Ende jeder Temperaturstufe erfolgte eine Probenahme. Bei keiner der so behandelten Zubereitungen kam es zu einer visuell erfassbaren Veränderung gegenüber der Ausgangslösung. Um den Einfluss des Luftsauerstoffs auf die Stabilität der oxidationsempfindlichen Proben während der Probenahme zu minimieren, wurden diese nach der Entnahme aus dem Druckwechsellautoklaven 30 s mit Stickstoff durchspült. Alle Proben wurden bis zur Analytik im Kühlschrank bei 6-8°C aufbewahrt (max. 2 h).

5.2.2.1.2 KURZZEITSTABILITÄT VON HUMANINSULIN

Die Kurzzeitstabilität von Humaninsulin wurde nach erfolgter Druckwechselbehandlung am Fertigarzneimittel Actrapid® (40 I.E./ml) und an frisch hergestellten wässrigen Insulin-Lösungen (20 I.E./ml) untersucht. Zur Herstellung der Insulin-Lösungen wurden zunächst 173,5 mg Zink-Insulin-Kristalle (Lilly, Greenfield, USA) in 250 ml demineralisiertem Wasser suspendiert. Um eine vollständige Auflösung der Hexamere zu gewährleisten, wurde im Anschluss durch Zugabe von 1M Salzsäure ein pH-Wert von 2,5 eingestellt. Nach abgeschlossenem Auflösungsprozess wurde die Lösung mit 1M Natriumhydroxid-Lösung neutralisiert und für ca. 30 s mit steril filtriertem Stickstoff durchspült.

Zusammensetzung:

<u>Actrapid® 40 I.E./ml</u>	<u>Insulin-Lösung-Lilly 20 I.E./ml</u>
1,4 mg/ml Humaninsulin (r-DNS)	173,5 mg Zink-Humaninsulin (kristallin, r-DNS)
Wasser für Injektionszwecke	250,03 g destilliertes Wasser
Salzsäure	1,00 ml 1M Salzsäure
Natriumhydroxid	1,05 ml 1M Natriumhydroxid-Lösung
Glycerol	
m-Kresol	
Zinkchlorid	

Die Lagerung der Insulin-Zubereitungen erfolgte im Kühlschrank bei 6-8°C. Für jeden Druckwechsellversuch wurden 250 ml der entsprechenden Insulin-Zubereitung in den Druckwechsellautoklav überführt (Parr) und dem in Kap. 5.2.2.1.1 dargestellten Temperatur-Zeit-Regime unterworfen. Die Probenahmen erfolgten jeweils vor Beginn der nächsten Temperaturstufe. Darüber hinaus wurden Proben direkt vor und nach der ersten Druckbeaufschlagung entnommen. Die notwendigen Teilentspannungen erfolgten analog

den Entkeimungsversuchen in 2 l-Laborflaschen. Eine Überführung der Proben in 250 ml-Laborflaschen und eine anschließende Spülung mit sterilem Stickstoff diente der Minimierung des Kontaktes mit Luftsauerstoff. Abschließend wurden die Proben in mit Stickstoff vorgespülten und luftdicht verschlossenen 10 ml-ISO-Injektionsflaschen abgefüllt und bis zur Analytik im Kühlschrank bei 6-8°C aufbewahrt.

Abweichend von dem bisherigen Vorgehen wurde die Stabilität der Humaninsulin-Lösungen im Druckwechselprozess nicht nur mit Stickstoff als Prozessgas, sondern auch mit Distickstoffmonoxid untersucht. Da eine Sterilisation im Endbehältniss bzw. eine finale Sterilfiltration von Humaninsulin-Lösungen keine praktische Bedeutung haben, wurde auf eine vergleichende Untersuchung an dieser Stelle verzichtet.

5.2.2.1.3 BESCHLEUNIGTER HALTBARKEITSTEST

Die Untersuchung der Langzeitstabilität erfolgte modellhaft mit dem Wirkstoff L-Epinephrinhydrogentartrat. Dazu wurden vier Chargen unterschiedlicher Zusammensetzung mit einem Volumen von jeweils 200 ml hergestellt. Die Chargen Epi0106 und Epi0206 stellten reine 1 %ige L-Epinephrinhydrogentartrat-Lösungen in Phosphatpuffer pH 7,0 R dar. Die Chargen Epi0306 und Epi0406 wurden in Anlehnung an das Fertigarzneimittel Adrenalin 1:1.000 Jenapharm® hergestellt und beinhalteten daher neben dem Wirkstoff ein Antioxidans (Natriummetabisulfit) und einen isotonisierenden Zusatz (Natriumchlorid).

Zusammensetzung:

Charge Epi0106

2,002 g Epinephrinhydrogentartrat

198,07 g Phosphatpuffer pH 7,0 R

Charge Epi0306

0,360 g Epinephrinhydrogentartrat

0,201 g Natriummetabisulfit

1,688 g Natriumchlorid

197,74 g destilliertes Wasser

Charge Epi0206

2,000 g Epinephrinhydrogentartrat

198,05 g Phosphatpuffer pH 7,0 R

Charge Epi0406

0,360 g Epinephrinhydrogentartrat

0,202 g Natriummetabisulfit

1,689 g Natriumchlorid

197,70 g destilliertes Wasser

Zur Entfernung des gelösten Sauerstoffs wurden die hergestellten Lösungen 15 min mit Stickstoff durchspült. Danach erfolgte die Abfüllung der Nullproben (6 x 10 ml) in vorverschlossene, stickstoffgespülte 10 ml-ISO-Injektionsflaschen. Die restliche Lösung (ca. 120 ml) wurde unter Ausschluss von Luftsauerstoff in den Druckwechselautoklav

überführt. In Anlehnung an die mikrobiologischen Untersuchungen wurde der Temperatureinfluss bei 25 und 40°C untersucht. Die Probenahme erfolgte dabei so, dass nach einer Stunde bei 25°C und 500 bar die Hälfte der Lösung in eine stickstoffgespülte Laborflasche entspannt wurde. Nach Temperaturerhöhung auf 40°C und einer weiteren Stunde wurde die im Autoklav verbliebene Restmenge ebenfalls in eine stickstoffgespülte Laborflasche entspannt. Die Abfüllung der druckwechselbehandelten Proben erfolgte entsprechend der Abfüllung der unbehandelten Proben. Die Stabilitätsuntersuchung wurde gemäß ICH-Leitlinie Q1A (R2) als Beschleunigungsprüfung durchgeführt (40°C; 75 % rel. Feuchte; 6 Monate). Diese extremen Lagerbedingungen sollten eine kurzfristige Beurteilung der relevanten chemischen Veränderungen ermöglichen [191, 192].

5.2.2.2 L-EPINEPHRIN-, D-PENICILLAMIN- UND PHYSOSTIGMIN-ANALYTIK (HPLC)

Gerät: Hochdruckgradientensystem (Shimadzu, Duisburg)
 Steuerung: SCL-10 A VP
 Autosampler: SIL-10A
 Detektor: UV/VIS-Detektor SPD-10 AV
 Software: CLASS-VP version 6.1

Methode A (L-Epinephrinhydrogentartrat)

Säule: Luna C18 (2); 250/4,6 (Phänomenex, Aschaffenburg)
 Eluent A (15 %): Acetonitril
 Eluent B (85 %): Natriumoctansulfonat 0,1 %; Triethylamin 0,2 %; Wasser; mit Phosphorsäure 85 % auf pH 2,5
 Flussrate: 1 ml/min
 Injektionsvolumen: 10 µl
 Probenvorbereitung: Verdünnung 1:10 mit Acetonitril:demineralisiertes Wasser (50:50)
 Temperatur: 30°C
 Detektion: 225 nm/310 nm

Tab. 20: Eichgerade von L-Epinephrinhydrogentartrat in demineralisiertem Wasser bei 225 nm ($\bar{x} \pm s$, n=3)

L-Epinephrinhydrogentartrat-Konzentration [g/l]	Peakfläche [mV·min]
0,12	1142,6±10,2
0,24	2347,9±26,0
0,47	4747,1±32,2
0,95	9317,8±112,0
1,19	11612,9±142,3
Regressionsgerade	y=9632,6x+45,0; R=0,99980

Tab. 21: Eichgerade von Adrenochrom in demineralisiertem Wasser bei 310 nm ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Adrenochrom-Konzentration [g/l]	Peakfläche [mV·min]
0,0015	77,7±0,9
0,003	160,8±1,7
0,006	332,2±1,3
0,015	847,4±10,2
0,031	1668,7±15,5
0,061	3286,3±40,4
Regressionsgerade	y=53058,9x+10,4; R=0,99991

Methode B (D-Penicillamin)

Säule: Nucleosil Nautilus; 250/4,6; 100-5 (Macherey-Nagel, Düren)
 Eluent: Methansulfonsäure 0,2 %; Natriumedetat 0,01 %; Wasser
 Flussrate: 1 ml/min
 Injektionsvolumen: 10 µl
 Probenvorbereitung: unverdünnte Injektion
 Temperatur: 30°C
 Detektion: 229 nm

Tab. 22: Eichgerade von D-Penicillamin in demineralisiertem Wasser bei 229 nm ($\bar{x} \pm s$, n=3)

D-Penicillamin-Konzentration [g/l]	Peakfläche [mV·min]
1,00	398,8±3,5
2,08	831,1±8,9
5,19	2092,3±13,8
8,30	3279,2±40,0
10,38	4089,5±50,7
Regressionsgerade	y=387,9x+23,4; R=0,99986

Tab. 23: Eichgerade von Penicillamindisulfid in demineralisiertem Wasser bei 229 nm ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Penicillamindisulfid-Konzentration [g/l]	Peakfläche [mV·min]
0,50	959,2±7,6
1,02	1963,6±24,9
2,56	4904,6±49,0
4,09	7620,9±105,9
5,11	9630,9±126,8
Regressionsgerade	y=1840,8x+62,5; R=0,99983

Methode C (Physostigminsalicylat)

Säule: Luna C18 (2); 250/4,6 (Phänomenex, Aschaffenburg)
 Eluent A (20 %): Acetonitril
 Eluent B (80 %): Natriumoctansulfonat 0,1 %; Triethylamin 0,2 %; Wasser; mit Phosphorsäure 85 % auf pH 2,5
 Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 10 µl
 Probenvorbereitung: Verdünnung 1:10 mit Acetonitril:demineralisiertes Wasser (50:50)
 Temperatur: 30°C
 Detektion: 310 nm

Tab. 24: Eichgerade von Physostigminsaliicylat in demineralisiertem Wasser bei 310 nm ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Physostigminsaliicylat-Konzentration [g/l]	Peakfläche [mV·min]
0,12	470,7±4,3
0,27	1051,1±12,4
0,68	2641,8±17,2
1,09	4158,9±50,9
1,36	5197,5±65,5
Regressionsgerade	y=3752,5x+31,5; R=0,99991

Tab. 25: Eichgerade von Eserolinfumarat in demineralisiertem Wasser bei 310 nm ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Eserolinfumarat-Konzentration [g/l]	Peakfläche [mV·min]
0,17	879,3±9,6
0,42	2267,5±24,3
0,67	3649,9±24,3
0,83	4563,7±60,4
1,12	5933,1±61,9
Regressionsgerade	y=5297,6x+20,6; R=0,99926

5.2.2.3 PARAOXON-ANALYTIK (HPLC)

Methode D [193]

Gerät: HP 1100 series (Agilent, Böblingen)
 Steuerung: G 1322A
 Autosampler: G 1313A
 Detektor: UV/VIS-Detektor G 1315A
 Säule: Licrosorb-Licrophase C-18; 250/4,0 (Merck, Darmstadt)
 Eluent A (50 %): Acetonitril
 Eluent B (50 %): Wasser
 Flussrate: 1 ml/min
 Injektionsvolumen: 10 µl
 Probenvorbereitung: unverdünnte Injektion
 Temperatur: 25°C
 Detektion: 280 nm

Tab. 26: Eichgerade von Paraoxon in demineralisiertem Wasser bei 280 nm ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Paraoxon-Konzentration [mg/l]	Peakfläche [mV·min]
3,13	92,7±0,8
6,25	181,5±2,5
12,50	359,1±10,0
25,00	725,1±9,6
50,00	1451,0±18,9
Regressionsgerade	y=28,6x-1,9; R=0,99996

5.2.2.4 INSULIN-ANALYTIK (HPLC, UV/VIS, ZIRKULARDICHROISMUS)Methode E (HPLC)

Gerät:	Hochdruckgradientensystem (Kontron, Gross-Zimmern)
Steuerung:	Multiport
Autosampler:	465
Detektor:	UV/VIS-Detektor 430 A
Software:	KromaSystem 2000
Säule:	Pursuit C-18; 250/4,6 (Varian, Darmstadt)
Eluent A (42 %):	Natriumsulfat, wasserfrei 2,84 %; Phosphorsäure 0,27 %; Wasser; mit Ethanolamin auf pH 2,7
Eluent B (58 %):	Eluent A:Acetonitril = 55:45 (V/V)
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Probenvorbereitung:	0,2 ml Probe + 0,75 ml demineralisiertes Wasser + 0,01 %ige Phenol-Lösung (interner Standard) + 0,024 ml 1M Salzsäure
Temperatur:	40°C
Detektion:	214 nm

Tab. 27: Eichgerade von Humaninsulin in demineralisiertem Wasser bei 214 nm ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Humaninsulin-Konzentration [mg/l]	Peakfläche [mV·min]
0,09	40,6±0,4
0,17	85,8±0,8
0,35	174,8±1,4
0,69	363,6±4,3
1,39	739,5±7,7
Regressionsgerade	y=531,4x-8,2; R2=0,99995

Methode F (UV/VIS)

Gerät: UV/VIS Photometer 8435 (Agilent, Böblingen)

Software: UV-Visible ChemStation

Messzelle: Quarzküvette QS, Schichtdicke 1 cm

Verdünnungsmittel: demineralisiertes Wasser (pH 6,8)

Methode G (Zirkulardichroismus)

Gerät: Zirkulardichroismus Photometer 500C (Jasco, Gross-Umstadt)

Messzelle: Quarzküvette, Schichtdicke 0,1 cm

Verdünnungsmittel: demineralisiertes Wasser (pH 6,8)

5.3 ERGEBNISSE

5.3.1 L-EPINEPHRINHYDROGENTARTRAT

5.3.1.1 KURZZEITSTABILITÄT

Erste Aussagen über die Stabilität der wässrigen L-Epinephrinhydrogentartrat-Lösungen konnten durch eine sich direkt an die Sterilisation anschließende pH-Wert-Bestimmung sowie eine visuelle Bewertung der Proben getroffen werden (Tab. 28). Die erhaltenen Ergebnisse ließen nicht in jedem Fall eine Unterscheidung zwischen begasten und unbegasten Zubereitungen zu. Daraus war zu schließen, dass auch durch Stickstoffbegasung die oxidative Zersetzung der Arzneistoffe nicht komplett unterbunden werden kann.

Tab. 28: Eigenschaften der L-Epinephrinhydrogentartrat-Lösungen in Abhängigkeit von der Herstellungs- und Sterilisationsmethode

Herstellungs-Methode	Puffer pH 4,5	Puffer pH 7,0	Puffer pH 9,0	destilliertes Wasser; pH 6,8
Nullprobe unbegast	farblose, klare Lösung, pH 3,6	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 6,4	rötliche, klare Lösung, pH 7,3	farblose, klare Lösung, pH 3,6
Sofortprobe unbegast	schwach-gelbe, trübe Lösung, pH 3,6	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 6,3	gelbe, klare Lösung, pH 7,2	farblose, klare Lösung, pH 3,5
Dampfsterilisation unbegast	braune, trübe Lösung, dunkler Niederschlag, pH 3,6	rotbraune, trübe Lösung, dunkler Niederschlag, pH 6,3	braune, trübe Lösung, dunkler Niederschlag, pH 7,3	gelbbraune, trübe Lösung, dunkler Niederschlag, pH 3,5
Filtration unbegast	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 3,9	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 6,4	orange, klare Lösung, pH 7,3	farblose, klare Lösung, pH 3,5
Nullprobe begast	farblose, klare Lösung, pH 3,6	farblose, klare Lösung, pH 6,4	dunkel-orange, klare Lösung, pH 7,3	farblose, klare Lösung, pH 3,4
Sofortprobe begast	farblose, klare Lösung, pH 3,6	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 6,3	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 7,2	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 3,6
Dampfsterilisation begast	gelbe, trübe Lösung, pH 3,5	hellbraune, trübe Lösung, dunkler Niederschlag, pH 6,4	orange, trübe Lösung, dunkler Niederschlag, pH 7,5	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 3,5
Filtration begast	farblose, klare Lösung, pH 3,6	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 6,3	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 7,3	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 3,5

Es ist zu vermuten, dass trotz 15-minütiger Stickstoffbegasung geringe Mengen Luftsauerstoff in der Lösung verbleiben, die genügen, um den oxidativen Abbau zu initiieren. Darüber hinaus konnte der erwartete pH-Wert-abhängige Wirkstoffverlust bestätigt werden. Mit steigendem pH-Wert des Mediums war eine Steigerung der Farbintensität der Lösungen zu beobachten.

Die quantitative Analytik der Proben erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie. Dazu wurden Triethylamin und Natriumoctanosulfonat als Ionenpaarreagenzien dem Fließmittel zugesetzt. Durch Komplexbildung des hydrophilen, ionischen Analyten konnte damit eine Verlängerung der Retentionszeit erzielt werden. L-Epinephrinhydrogentartrat wurde bei einer Wellenlänge von 225 nm und Adrenochrom, welches das Hauptabbauprodukt darstellt, bei 310 nm detektiert (Abb. 105).

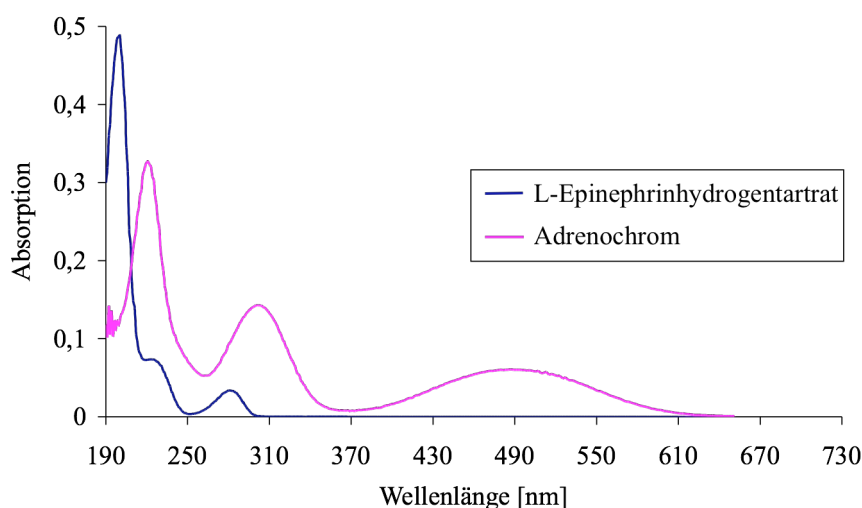


Abb. 105: UV-Spektrum von L-Epinephrinhydrogentartrat und Adrenochrom

Das verwendete Salz des L-Epinephrins erwies sich bei Behandlung mit den konventionellen Sterilisationsverfahren als sehr stabil; nur bei hoher thermischer Belastung und ungünstigen pH-Verhältnissen ($\text{pH} \geq 7,0$) nahm der Anteil an Epinephrinhydrogentartrat, gemessen an der Ausgangskonzentration, um mehr als 5 % ab (Abb. 106). Zwischen begasten und unbegasten Proben war aufgrund der geringen Restluftmenge in den befüllten Braunglasvials kein signifikanter Unterschied erkennbar. Auffällig war jedoch, dass der Adrenochrom-Gehalt der Lösung nicht in gleichem Maß zunahm, wie der Epinephrin-Gehalt abnahm (Abb. 107). Daraus konnte geschlossen werden, dass das gebildete Adrenochrom einer weiteren Oxidation unterliegt. Als primäre Abbauprodukte des Adrenochroms kommen dabei Oxadrenochrom und Adrenolutin in Betracht; zudem können polymere Strukturen entstehen, die als Epinephrin-Schwarz bezeichnet werden. Der beobachtete dunkle Niederschlag bei dampfsterilisierten Proben war ein Hinweis darauf.

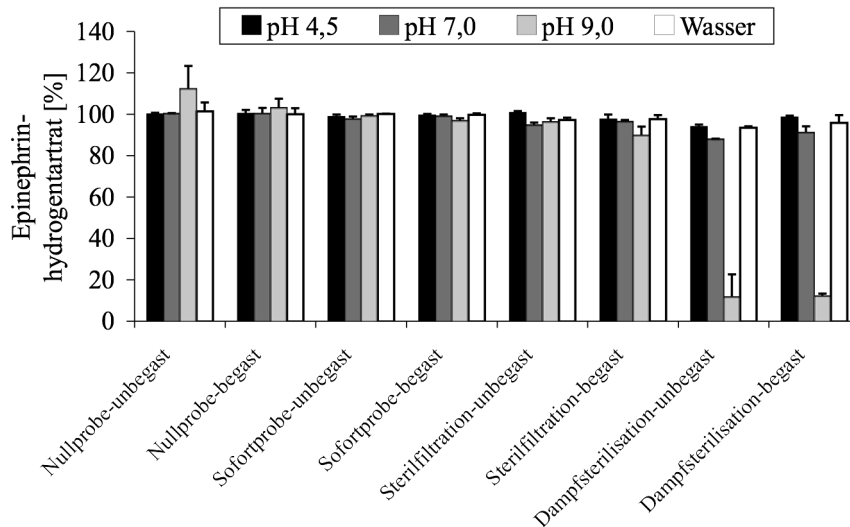


Abb. 106: Prozentualer Epinephrinhydrogentartrat-Gehalt nach konventioneller Sterilisation bezogen auf die Einwaage (\bar{x} + halbe Variationsbreite; n=2)

Gemäß den Ausführungen in Kap. 5.1.1, kam es im alkalischen Milieu zu einer verstärkten Abbaureaktion bedingt durch die höhere Oxidationsempfindlichkeit der dann monoanionisch vorliegenden Brenzkatechinstruktur. Neben dem beschriebenen oxidativen Abbau ist auch ein Wirkungsverlust durch Racemisierung des chiralen Epinephrinmoleküls möglich, durch die gewählte Analysenmethode jedoch nicht detektierbar. Die geringe Reaktionsgeschwindigkeit der Racemisierung lässt keinen nennenswerten Einfluss auf die Kurzzeitstabilität erwarten [194]. Da eine Racemisierung aber nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, beziehen sich alle Gehaltsangaben auf das Racemat.

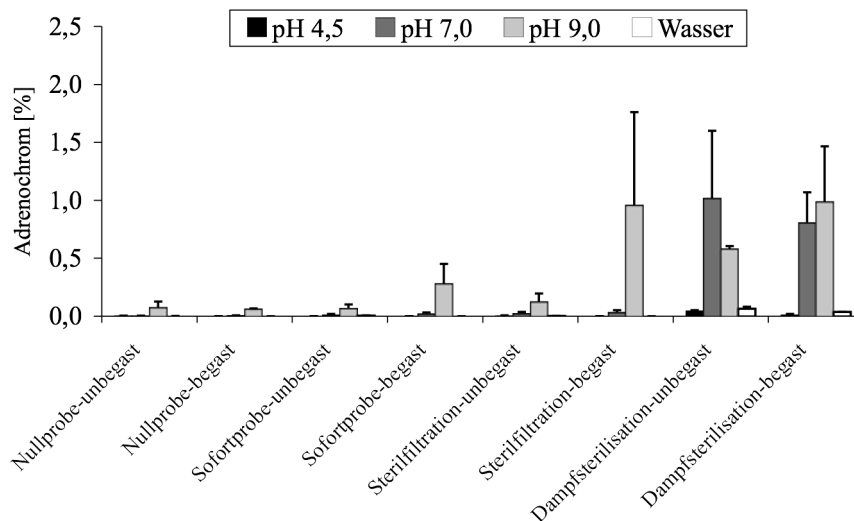


Abb. 107: Prozentualer Adrenochrom-Gehalt nach konventioneller Sterilisation bezogen auf die L-Epinephrinhydrogentartrat-Einwaage (\bar{x} + halbe Variationsbreite; n=2)

Auch während der Hochdruckautoklavierung erwies sich das eingesetzte L-Epinephrinhydrogentartrat als stabil (Abb. 108). Mit einem maximalen Wirkstoffverlust von < 5 % bei

Prozesstemperaturen bis 40°C waren die Ergebnisse mit denen nach Sterilfiltration erhaltenen vergleichbar.

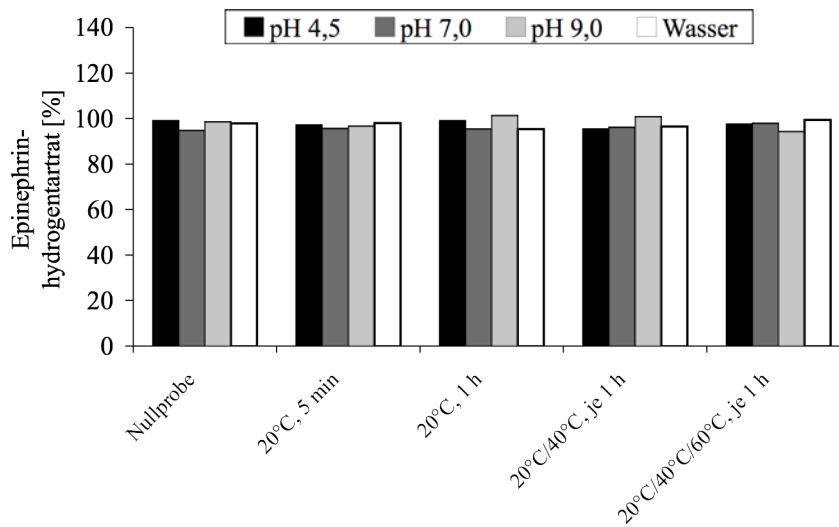


Abb. 108: Prozentualer Epinephrinhydrogentartrat-Gehalt nach Druckwechselbehandlung mit Stickstoff bei 500 bar bezogen auf die Einwaage

Nur die für den Wirkstoff ungünstigsten Prozessparameter – hoher pH-Wert in Kombination mit einer hohen Prozesstemperatur – bewirkten einen nennenswerten Anstieg der Adrenochromkonzentration (Abb. 109). Daraus ergibt sich für L-Epinephrin-Lösungen ein breites Prozessfenster für eine Entkeimung mit dem Druckwechselverfahren. Unter optimalen Bedingungen wäre damit sogar eine Prozesstemperatur von 60°C denkbar.

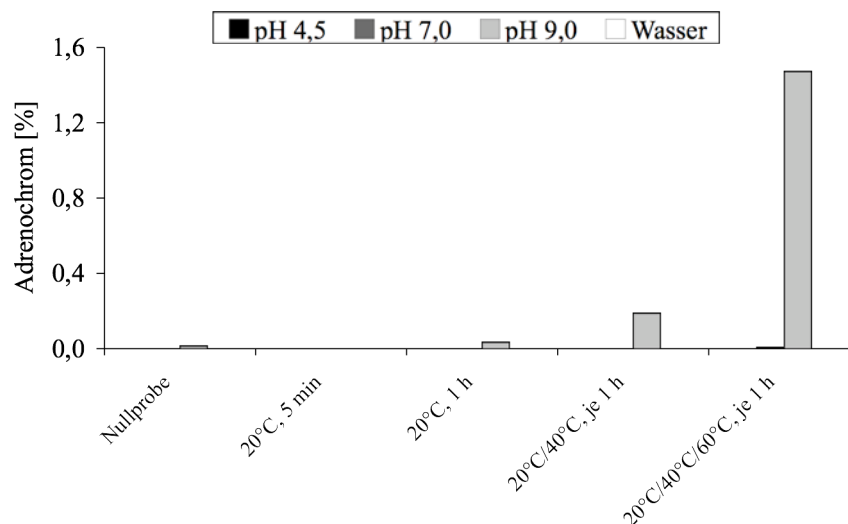


Abb. 109: Prozentualer Adrenochrom-Gehalt nach Druckwechselbehandlung mit Stickstoff bei 500 bar bezogen auf die L-Epinephrinhydrogentartrat-Einwaage

5.3.1.2 BESCHLEUNIGTER HALTBARKEITSTEST

Neben der Bewertung der Kurzzeitstabilität wurde an vier Chargen unterschiedlich zusammengesetzter L-Epinephrin-Lösungen die Langzeitstabilität nach Druckwechselbehandlung untersucht. Dazu wurden die druckwechselbehandelten und in ISO-Injektionsflaschen abgefüllten Proben unter den für beschleunigte Stabilitätsprüfungen festgelegten Bedingungen (40°C, 75 % rel. Feuchte) für 6 Monate im Klimaschrank eingelagert. Zum Zeitpunkt der Abfüllung wurden Wirkstoffgehalt (HPLC) sowie pH-Wert und Tonizität (nur Epi0306 und Epi0406) der Lösungen bestimmt. Während des Lagerungszeitraumes erfolgten vier weitere Gehaltsbestimmungen.

In Tab. 29 sind die Ergebnisse der pH-Wert-Untersuchung dargestellt. Dabei ist festzustellen, dass es bei den Chargen Epi0306 und Epi0406 in Folge der Druckwechselbehandlung zu einem statistisch signifikanten Anstieg des pH-Wertes kam.

Tab. 29: pH-Wert der untersuchten L-Epinephrinhydrogentartrat-Lösungen (Charge Epi0106-Epi0406) in Abhängigkeit von den Prozessbedingungen (Stickstoff, 500 bar); $\bar{x} \pm s$; n = 3; *, **, * Signifikanzniveau (t-Test) gegenüber der Nullprobe: 0,05; 0,01; 0,001 [195]**

	Epi0106	Epi0206	Epi0306	Epi0406
Nullprobe	4,88 ± 0,006	4,96 ± 0,006	3,67 ± 0,012	3,74 ± 0,006
25°C	4,88 ± 0,010	4,98 ± 0,000	4,21 ± 0,010 ***	4,13 ± 0,006 ***
40°C	4,90 ± 0,006	4,97 ± 0,012	4,20 ± 0,017 ***	4,11 ± 0,000 ***

Als Ursache für diese Veränderung kann die in Abb. 110 dargestellte Entstehung einer C-Sulfonsäure aus Epinephrin und Natriummetabisulfit angesehen werden, in deren Folge die Lösung an Wasserstoffprotonen respektive Hydroniumionen verarmte [194]. Der stabile pH-Wert der Natriummetabisulfit-freien Lösungen (Epi0106 und Epi0206) bestätigt diese Vermutung.

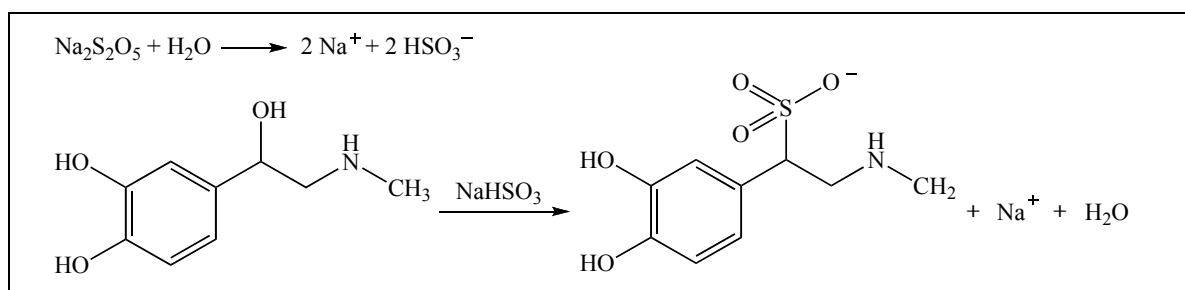


Abb. 110: Reaktionsmechanismus der Bildung einer C-Sulfonsäure aus Epinephrin

Bei den Chargen Epi0306 und Epi0406, die Zubereitungen zur Injektion entsprechen, war eine Bestimmung der Tonizität unerlässlich. Die beobachtete statistisch signifikante

Verringerung der Osmolalität nach Druckwechselbehandlung (Tab. 30) bei Epi0406 kann ebenfalls in der bereits erwähnten Bildung einer C-Sulfonsäure des Epinephrins begründet liegen, da es bei dieser Reaktion zu einer Verringerung der Anzahl an gelösten Teilchen kommt (ein Produkt der zugrunde liegenden Substitutionsreaktion ist Wasser, welches keinen Einfluss auf die kolligativen Eigenschaften eines wässrigen Systems hat). Aufgrund der fehlenden Signifikanz bei den Messunterschieden der Charge Epi0306 sind Messungenauigkeiten als Ursache nicht auszuschließen.

Tab. 30: Osmolalität und Gefrierpunktserniedrigung ΔT_G der untersuchten L-Epinephrinhydrogentartrat-Lösungen (Chargen Epi0306 und Epi0406) in Abhängigkeit von den Prozessbedingungen (Stickstoff, 500 bar); $\bar{x} \pm s$; n = 3; *, **, *** Signifikanzniveau (t-Test) gegenüber der Nullprobe: 0,05; 0,01; 0,001 [195]

Charge	Epi0306		Epi0406	
	Osmolalität [mosmol/kg]	ΔT_G [K]	Osmolalität [mosmol/kg]	ΔT_G [K]
Nullprobe	307,33 ± 13,27	0,57	303,02 ± 7,12	0,56
25°C	296,34 ± 8,19	0,55	278,88 ± 1,49 **	0,52
40°C	287,50 ± 16,48	0,53	264,44 ± 6,24 **	0,49

Die Ergebnisse der durchgeführten Gehaltsbestimmungen sind in Abb. 111 bis Abb. 114 dargestellt. Dabei ist ein deutlicher Unterschied zwischen den rein wässrigen Proben Epi0106 und Epi0206 und den isotonierten und stabilisierten Proben Epi0306 und Epi0406 zu erkennen. Überraschend war die höhere Wirkstoffstabilität der nicht stabilisierten Proben (Abb. 111 und Abb. 112).

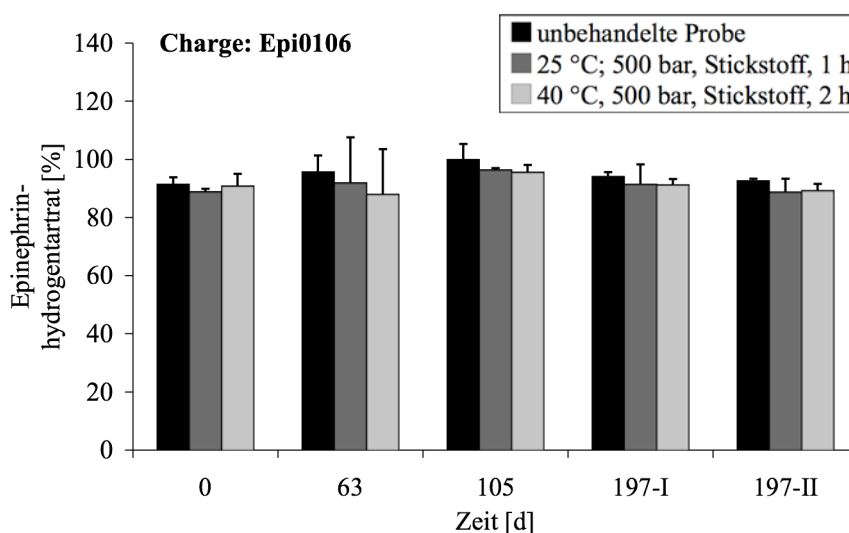


Abb. 111: Prozentualer Wirkstoffgehalt einer 1 %igen Epinephrinhydrogentartrat-Lösung in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bezogen auf die Einwaage; Beschleunigungsprüfung: 40°C, 75 % rel. Feuchte, 6 Monate; $\bar{x} + s$; n = 6

Die halblogarithmische Auftragung der Wirkstoffkonzentration gegen die Lagerungsdauer ergab unabhängig von den im Druckwechselprozess gewählten Parametern einen Anstieg der Geraden von annähernd Null. Eine für den Druckwechselprozess ausreichende Stabilität konnte damit belegt werden.

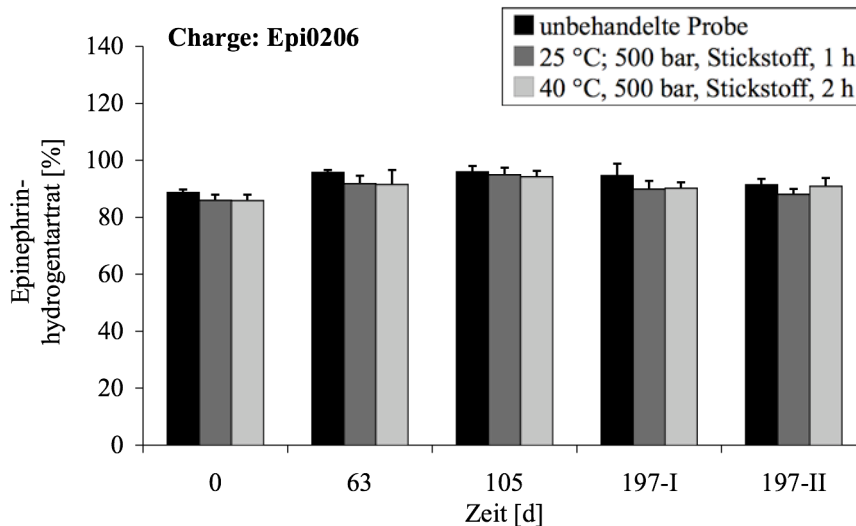


Abb. 112: Prozentualer Wirkstoffgehalt einer 1 %igen Epinephrinhydrogentartrat-Lösung in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bezogen auf die Einwaage; Beschleunigungsprüfung: 40°C, 75 % rel. Feuchte, 6 Monate; $\bar{x} + s$; n = 6

Demgegenüber wiesen die mit Natriummetabisulfit stabilisierten Proben eine deutliche zeitliche Abnahme der Epinephrin-Konzentration auf (Abb. 113 und Abb. 114). Die halblogarithmische Darstellung der Wirkstoffkonzentration gegen die Lagerungsdauer ergab einen linearen Zusammenhang zwischen beiden Größen. Bei der beobachteten Abbaureaktion ist somit von einer Kinetik 1. Ordnung auszugehen.

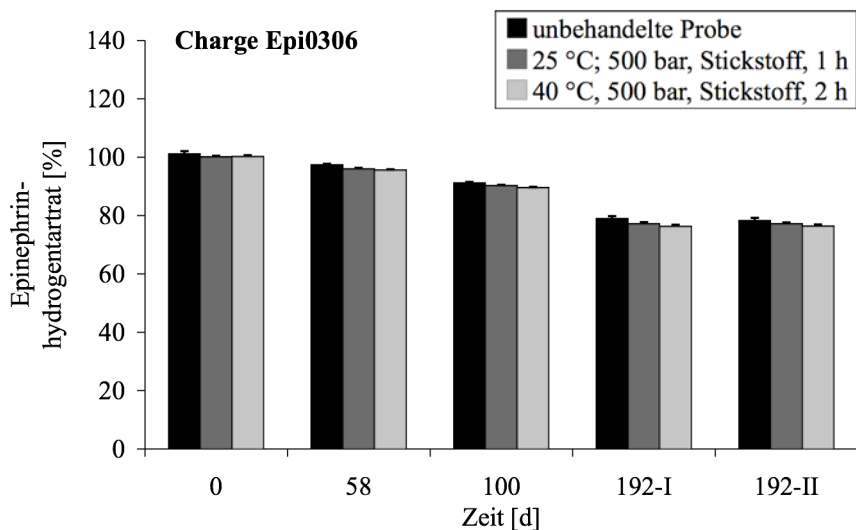


Abb. 113: Prozentualer Wirkstoffgehalt einer 0,18 %igen Epinephrinhydrogentartrat-Lösung in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bezogen auf die Einwaage; Beschleunigungsprüfung: 40°C, 75 % rel. Feuchte, 6 Monate; $\bar{x} + s$; n = 6

Anhand des Kurvenanstieges konnte unabhängig von der Prozesstemperatur während der Druckwechselbehandlung eine mittlere Halbwertszeit von 1,14 Jahren ermittelt werden. Auch hier ist, wie bei der pH-Wert-Zunahme, von einer fortschreitenden Sulfonierung des Epinephrin-Moleküls als Ursache für die Veränderung auszugehen. Langzeituntersuchungen an natriummetabisulfithaltigen L-Epinephrin-Lösungen bestätigen dies [194]. Die mit der eingeführten Sulfonsäuregruppe einhergehende Erhöhung der Polarität des Moleküls führte bei der verwendeten HPLC-Methode wahrscheinlich zu stark verkürzten Retentionszeiten (Einspritzpeak wird größer) und verhinderte dadurch eine messtechnische Erfassung des Metaboliten.

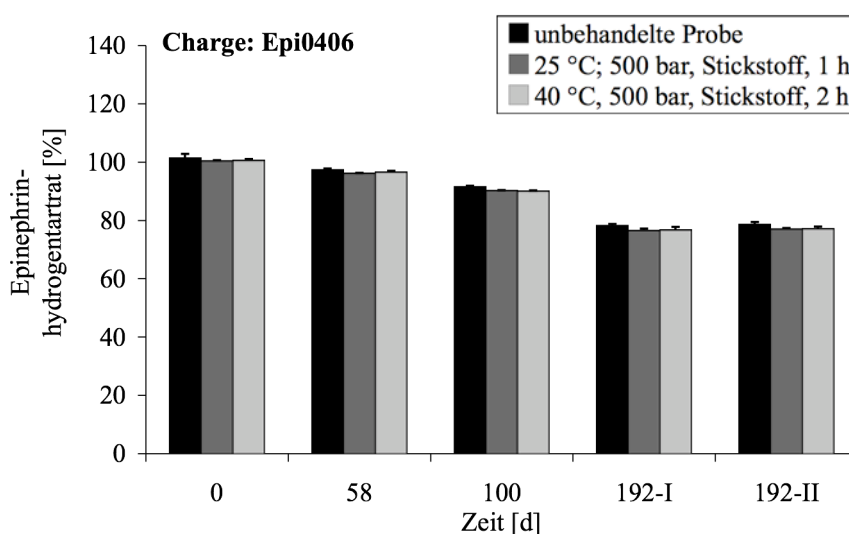


Abb. 114: Prozentualer Wirkstoffgehalt einer 0,18 %igen Epinephrinhydrogentartrat-Lösung in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bezogen auf die Einwaage; Beschleunigungsprüfung: 40°C, 75-% rel. Feuchte, 6 Monate; $\bar{x} + s$; n = 6

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Umbaureaktion ist daher auch bei den Chargen Epi0306 und Epi0406 von einer für den Druckwechselprozess ausreichend hohen Stabilität der Lösungen auszugehen. Die Wirkstoffkonzentration der untersuchten Lösungen zum Zeitpunkt t_0 ist ebenfalls ein Indiz dafür.

5.3.2 D-PENICILLAMIN

Als weitere oxidationsempfindliche Modellsubstanz kam D-Penicillamin zum Einsatz. Auch hier wurde zunächst die Stabilität des Wirkstoffes nach konventioneller Sterilisation mit gespanntem und gesättigtem Wasserdampf und nach Sterilfiltration untersucht. Dazu erfolgte analog den L-Epinephrin-Untersuchungen eine organoleptische Prüfung der Lösungen und die Bestimmung des pH-Wertes (Tab. 31). Daran anschließend wurde eine flüssigchromatographische Gehaltsbestimmung durchgeführt. Der Vergleich der pH-Werte

der unterschiedlich behandelten Lösungen zeigte hinsichtlich der Art der Behandlung nur einen geringen Einfluss des Verfahrens. Die aus dem Wirkstoffabbau resultierenden Farbveränderungen waren erwartungsgemäß ebenfalls sehr gering, da eine Verfärbung erst nach starkem Abbau eintritt [181]. Am deutlichsten konnte der oxidative Abbau der Wirkstoffmoleküle über den Geruch der Lösung wahrgenommen werden. Hier waren besonders die dampfsterilisierten Proben auffällig.

Tab. 31: Eigenschaften der D-Penicillamin-Lösungen in Abhängigkeit von der Herstellungs- und Sterilisationsmethode

Herstellungs-Methode	Puffer pH 4,5	Puffer pH 7,0	Puffer pH 9,0	destilliertes Wasser; pH 6,8
Nullprobe unbegast	farblose Lösung, schwacher Geruch, pH 4,5	farblose Lösung, schwacher Geruch, pH 6,7	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 7,5	farblose Lösung, schwacher Geruch, pH 4,6
Sofortprobe unbegast	farblose Lösung, schwacher Geruch, pH 4,9	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 6,6	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 7,9	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 4,6
Dampfsterilisation unbegast	farblose Lösung, starker Geruch, pH 5,2	gelbe Lösung, starker Geruch, pH 6,5	gelbe Lösung, starker Geruch, pH 7,4	leicht-gelbe Lösung, starker Geruch, pH 5,7
Filtration unbegast	farblose Lösung, schwacher Geruch, pH 5,2	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 6,6	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 7,8	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 5,1
Nullprobe begast	farblose Lösung, schwacher Geruch, pH 4,6	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 6,8	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 7,7	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 5,0
Sofortprobe begast	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 4,7	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 6,6	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 7,9	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 5,5
Dampfsterilisation begast	farblose Lösung, starker Geruch, pH 5,3	gelbe Lösung, starker Geruch, pH 5,7	gelbe Lösung, starker Geruch, pH 7,4	gelbe Lösung, starker Geruch, pH 5,9
Filtration begast	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 4,9	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 6,7	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 7,9	farblose Lösung, sehr schwacher Geruch, pH 4,6

Bei den flüssigchromatographischen Untersuchungen wurde neben der Bestimmung des Penicillamin-Gehaltes auch der Anteil des Abbauproduktes Penicillamindisulfid als Maß für die Stabilität der untersuchten 1 %igen Lösungen betrachtet. Frisch hergestellte Arzneistofflösungen enthielten 0,3 % Disulfid bezogen auf die Wirkstoffmasse. Wie aus Abb. 115 ersichtlich, kommt es auch bei Penicillamin-Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Abbau der Ausgangssubstanz. Ein alkalischer pH-Wert fördert demzufolge die Disulfidbildung (Abb. 116). Neben dem oxidativen Abbau der Wirkstoffmoleküle ist auch ein Wirkungsverlust

durch Racemisierung denkbar. Dies ist besonders kritisch, da das L-Enantiomer ein hohes toxisches Potential bei gleichzeitig verbesserten Resorptionseigenschaften aufweist. Leider war eine enantiomerenreine Gehaltsbestimmung mit der zur Verfügung stehenden Analytik nicht möglich und bleibt daher zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

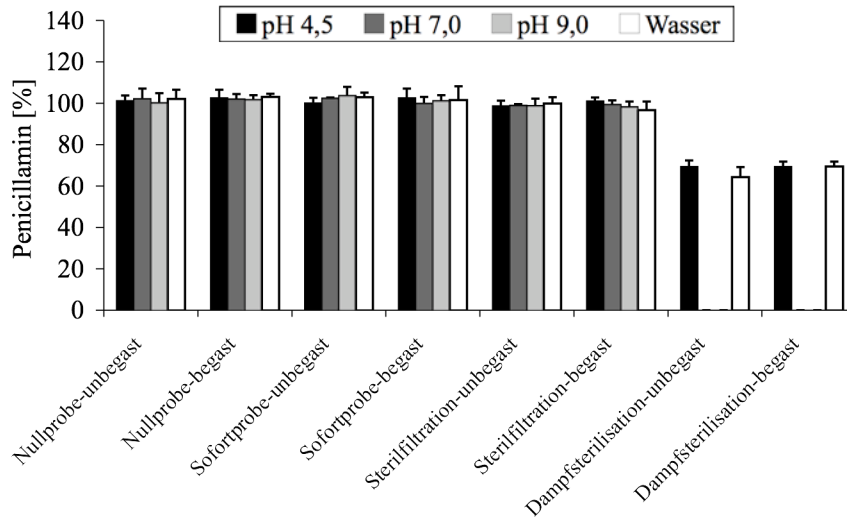


Abb. 115: Prozentualer Penicillamin-Gehalt nach konventioneller Sterilisation bezogen auf die Einwaage (\bar{x} + halbe Variationsbreite; n=2)

Bei der Dampfsterilisation der Proben mit Puffer pH 7,0 und 9,0 kam es zu einer vollständigen Zersetzung des Penicillamins, welche über die Disulfidbildung hinausging (Abb. 116).

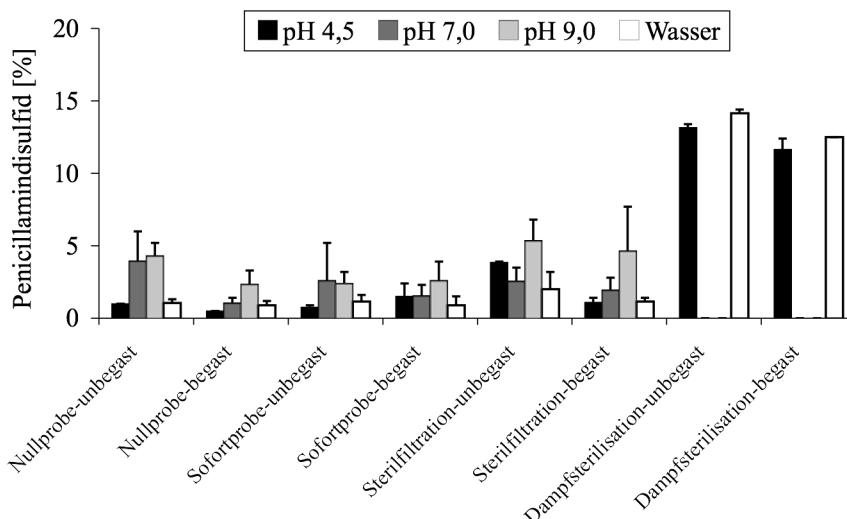


Abb. 116: Prozentualer Penicillamindisulfidgehalt nach konventioneller Sterilisation bezogen auf die D-Penicillamin-Einwaage (\bar{x} + halbe Variationsbreite; n=2)

Die Zersetzungsprodukte einschließlich des Disulfides sind bei diesen pH-Werten in ihrer Vielfalt nicht mehr leicht quantifizierbar. Die Lösungen mit schwach saurem pH-Wert sind

wesentlich stabiler; nach der Dampfsterilisation liegen noch ca. 50% des Wirkstoffes vor. Bei der vom DAC/NRF 2004 empfohlenen Sterilisation mittels Filtration durch bakterienzurückhaltende Filter war eine wesentlich geringere Abnahme der Wirkstoffkonzentration und damit einhergehend eine geringere Zunahme der Disulfid-Konzentration zu beobachten. Darüber hinaus war an dieser Stelle ein schwach ausgeprägter protektiver Effekt der Stickstoffbegasung zu erkennen.

Die Behandlung der Proben im Druckwechselautoklav führte schon bei Raumtemperatur zu einem verstärkten Penicillamin-Abbau und damit verbunden zu einer vermehrten Disulfidbildung, wenn der pH-Wert der Lösung > 7 war (Abb. 117 und 118). Es ist jedoch anzunehmen, dass nicht der Druckwechselprozess für den Abbau verantwortlich ist, sondern das Vorhandensein von Luftsauerstoff in den Proben und die ungünstigen pH-Verhältnisse, da bereits die Nullproben ähnlich hohe Disulfid-Konzentrationen aufwiesen. Das Stabilitätsoptimum wässriger D-Penicillamin-Lösungen liegt im Bereich von pH 2-4.

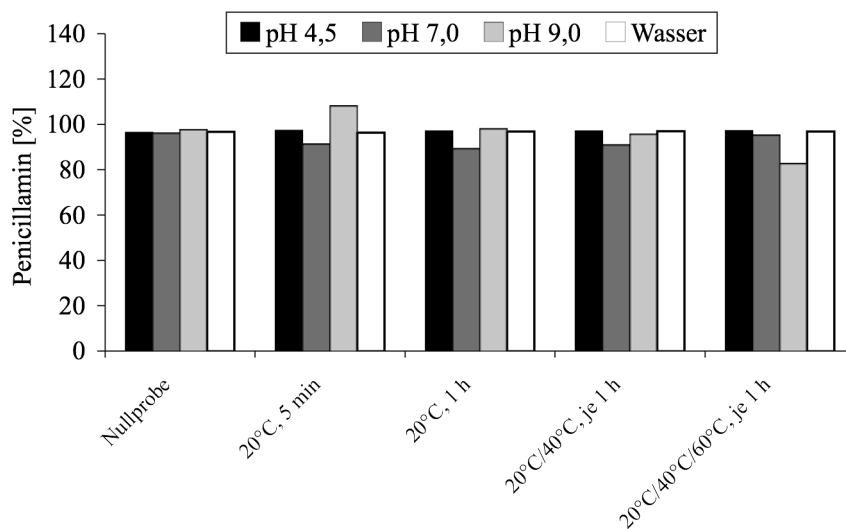


Abb. 117: Prozentualer Penicillamin-Gehalt nach Druckwechselbehandlung mit Stickstoff bei 500 bar bezogen auf die Einwaage

Die Erhöhung der Prozesstemperatur von 20 auf 40°C führte unabhängig vom pH-Wert der Lösung zu keiner nennenswerten Erhöhung des Disulfidgehaltes. Bei den schwach sauren Proben (nahe dem Stabilitätsoptimum) war erst bei Temperaturen ab 60°C ein deutlicher Abbau erkennbar. Die Wahl des richtigen pH-Wertes der D-Penicillamin-Formulierung ist somit die wichtigste Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Druckwechselverfahrens. Da flüssige D-Penicillamin-Zubereitungen im Wesentlichen in der Augenheilkunde Anwendung finden, ist eine Umsetzung dieser Forderung, Isotonie der Lösung vorausgesetzt, auch in den meisten Fällen möglich. Am Auge stellt sich nach der Applikation der physiologische pH-Wert rasch wieder ein.

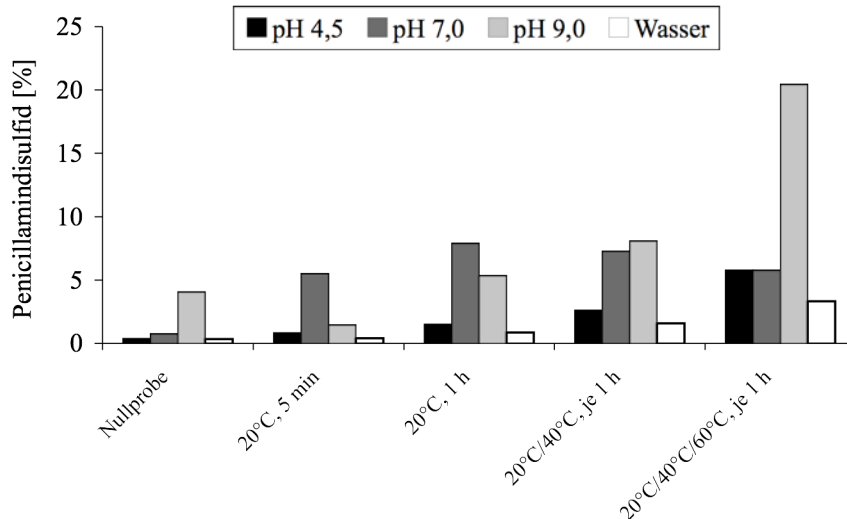


Abb. 118: Prozentualer Penicillamindisulfid-Gehalt nach Druckwechselbehandlung mit Stickstoff bei 500 bar bezogen auf die D-Penicillamin-Einwaage

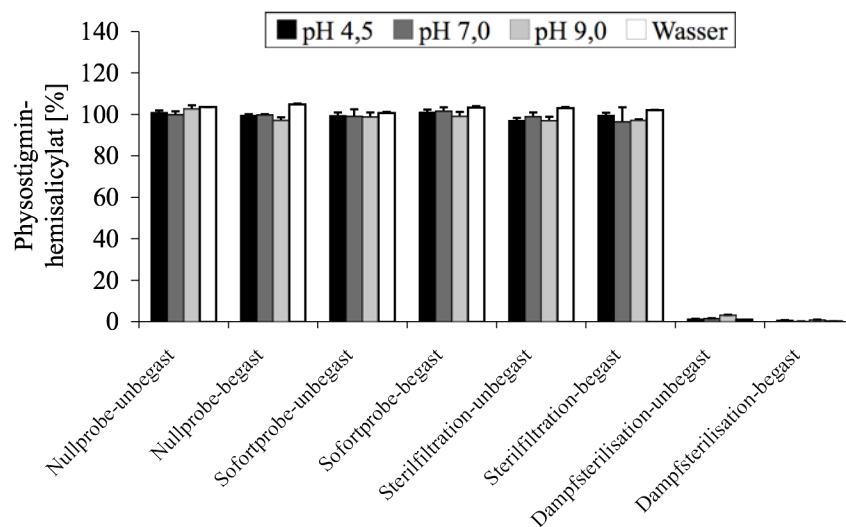
5.3.3 PHYSOSTIGMINHEMISALICYLAT

Das Physostigmin-Molekül ist aufgrund seiner chemischen Struktur sowohl hydrolyse- als auch oxidationsempfindlich. Erste Hinweise auf die Stabilität wässriger Zubereitungen während der Dampfsterilisation bzw. der Sterilfiltration konnten durch die visuelle Bewertung der Lösungen und die pH-Wert-Bestimmung erhalten werden (Tab. 32). Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass auch hier ein pH-Wert-abhängiger Zersetzungsprozess, mit zunehmender Reaktionsgeschwindigkeit bei steigenden pH-Werten, vorliegt. Des Weiteren war ein vom pH-Wert der Lösung unabhängiger Wirkstoffabbau während der Dampfsterilisation zu beobachten. Die Ergebnisse der Sterilfiltration, als Entkeimungsmethode der Wahl, waren mit denen der unbehandelten Proben vergleichbar. Stabilitätsunterschiede zwischen begasten und unbegasten Proben ergaben sich nur bei den dampfsterilisierten Proben.

Tab. 32: Eigenschaften der Physostigminhemisalicylat-Lösungen in Abhängigkeit von der Herstellungs- und Sterilisationsmethode

Herstellungsmethode	Puffer pH 4,5	Puffer pH 7,0	Puffer pH 9,0	destilliertes Wasser; pH 6,8
Nullprobe unbegast	farblose, klare Lösung, pH 4,8	farblose, klare Lösung, pH 6,8	rötliche, klare Lösung, pH 8,1	farblose, klare Lösung, pH 5,6
Sofortprobe unbegast	farblose, klare Lösung, pH 4,9	farblose, klare Lösung, pH 6,9	farblose, klare Lösung, pH 8,1	farblose, klare Lösung, pH 5,7
Dampfsterilisation unbegast	rote, klare Lösung, pH 6,1	braune, klare Lösung, pH 6,6	grüne, klare Lösung, pH 7,9	rote, klare Lösung, pH 6,2
Filtration unbegast	farblose, klare Lösung, pH 4,8	farblose, klare Lösung, pH 6,8	rötliche, klare Lösung, pH 8,1	farblose, klare Lösung, pH 5,4
Nullprobe begast	farblose, klare Lösung, pH 4,8	farblose, klare Lösung, pH 6,8	rötliche, klare Lösung, pH 8,1	farblose, klare Lösung, pH 5,8
Sofortprobe begast	farblose, klare Lösung, pH 4,9	farblose, klare Lösung, pH 6,9	farblose, klare Lösung, pH 8,1	farblose, klare Lösung, pH 5,8
Dampfsterilisation begast	rötliche, klare Lösung, pH 6,1	rötliche, klare Lösung, pH 6,8	rötliche, klare Lösung, pH 7,6	rötliche, klare Lösung, pH 6,4
Filtration begast	farblose, klare Lösung, pH 4,8	farblose, klare Lösung, pH 6,9	rötliche, klare Lösung, pH 8,1	farblose, klare Lösung, pH 6,1

Bei der HPLC-Analytik der Physostigminhemisalicylat-Proben lag das Hauptinteresse neben der Quantifizierung des verbliebenen Wirkstoffanteils an Physostigminhemisalicylat (Abb. 119) in der Erfassung des gebildeten Eserolins (farblos), welches das primäre Abbauprodukt darstellt.

**Abb. 119: Prozentualer Physostigminhemisalicylat-Gehalt nach konventioneller Sterilisation bezogen auf die Einwaage (\bar{x} + halbe Variationsbreite; n=2)**

Wie aus Abb. 119 zu entnehmen ist, erfolgte der Physostigmin-Abbau weitgehend unabhängig vom pH-Wert der Lösung, obwohl Hydroxid-Ionen den Abbau des Urethans fördern. Der Hydrolyse des Urethans unter Bildung von Eserolin (Abb. 120) schließt sich die Oxidation zum Rubreserin (rot) an. In welchem Umfang diese Oxidation stattfindet, hängt von der Menge des vorhandenen Sauerstoffs und vom pH-Wert der Lösung ab. Bei den unbegasteten Proben kam es zu einer erwartungsgemäß stärkeren Rotfärbung als bei den begasteten (Tab. 32). In einem Fall kam es zu einer Grünfärbung der Probe (dampfsterilisiert; Puffer pH 9,0; unbegast). Als Ursache wird eine unvollständige Oxidation des Physostigmins angenommen. Ein Indiz dafür war der Farbumschlag nach rot (Rubreserin) bei Luftkontakt. Des Weiteren waren die Proben mit alkalischem pH-Wert stärker gefärbt. Ein hoher pH-Wert erhöht demzufolge nur die Sensitivität des Eserolins gegenüber Oxidationsmitteln. Ein weiterer Beleg dafür ist der reduzierte Eserolingehalt in den alkalischen Proben (Abb. 120).

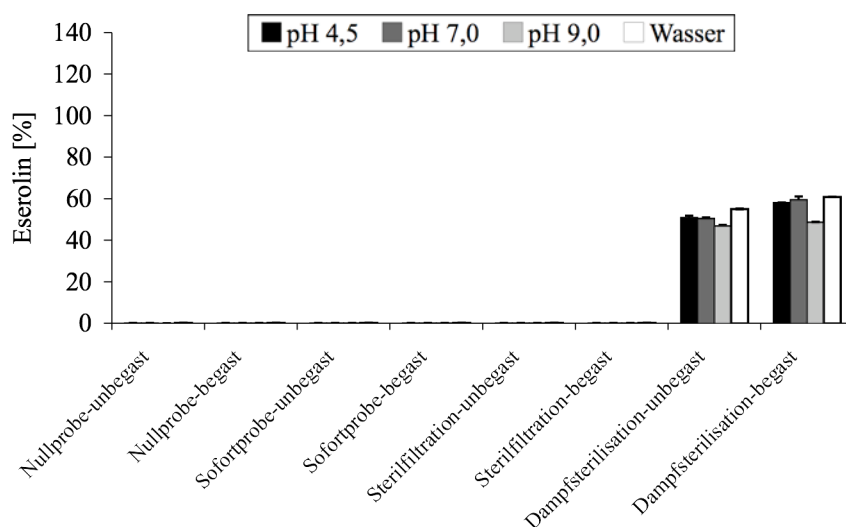


Abb. 120: Prozentualer Eserolin-Gehalt nach konventioneller Sterilisation bezogen auf die Physostigminhemisulfat-Einwaage (\bar{x} + halbe Variationsbreite; n=2)

Das verwendete Salz des Physostigmins erwies sich bei der Behandlung im Hochdruckautoklav als stabil; bei thermischer Belastung nahm der Anteil an Physostigmin, bezogen auf die Ausgangskonzentration, jedoch um mehr als 7 % ab (Abb. 121). Der hohe Wirkstoffverlust der wässrigen Physostigmin-Lösungen (pH 5,9) bei 40°C ist durch den pH-Wert nicht zu erklären. Eine erhöhte Stabilität gegenüber der bei pH 7,0 gepufferten Zubereitung wäre aufgrund der pH-Abhängigkeit von Hydrolyse- und Oxidationsreaktionen eher zu erwarten gewesen. Der verstärkte Wirkstoffabbau lässt sich eventuell mit dem höheren Sauerstoffgehalt von frisch destilliertem Wasser erklären.

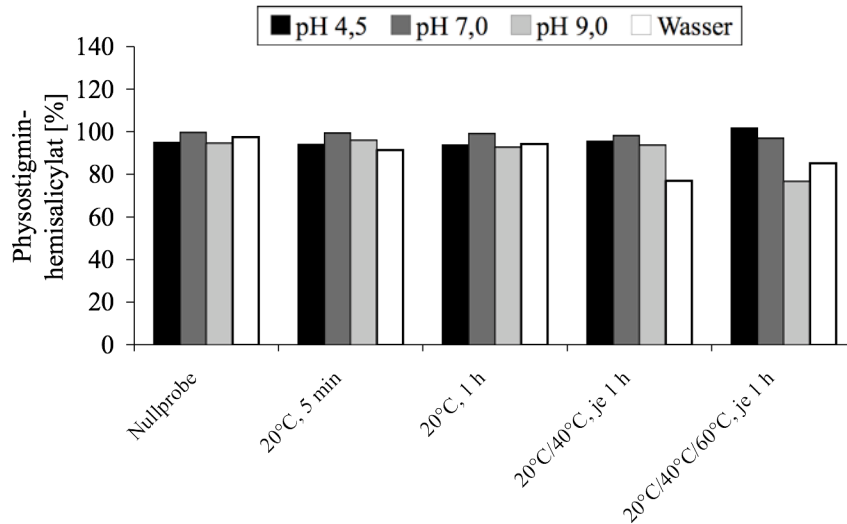


Abb. 121: Prozentualer Physostigminhemicalicylat-Gehalt nach Druckwechselbehandlung mit Stickstoff bei 500 bar bezogen auf die Einwaage

Um die Sicherheit der Aussage zu möglichen Abbaureaktionen während des Druckwechselverfahrens zu erhöhen, wurde nicht nur der Gehalt an Physostigmin in den einzelnen Proben berücksichtigt, sondern auch der des primären Abbauproduktes Eserolin. Da es sich hierbei um ein Hydrolyseprodukt der im Physostigmin-Molekül vorhandenen Carbaminsäureester-Struktur handelte, war bei steigendem pH-Wert der Lösung auch mit einer Zunahme an Eserolin zu rechnen. Wie Abb. 122 zeigt, wies aber nicht die alkalisch gepufferte Lösung den höchsten Eserolin-Gehalt auf, sondern jene mit einem pH-Wert von 7,0. Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, dass es im alkalischen Milieu zu einer weiteren Zersetzung des Eserolins kam.

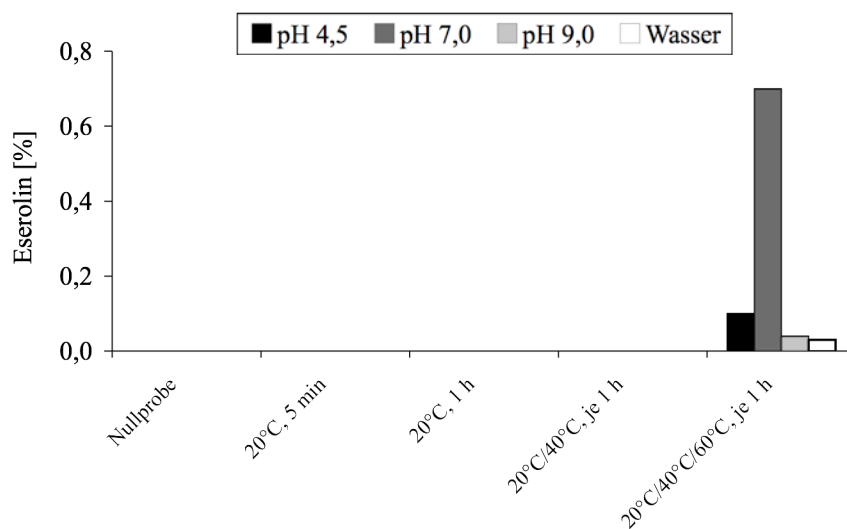


Abb. 122: Prozentualer Eserolin-Gehalt nach Druckwechselbehandlung mit Stickstoff bei 500 bar bezogen auf die Physostigminhemisulfat-Einwaage

Alle alkalischen Proben wiesen in ihrem Chromatogramm einen zusätzlichen Peak auf, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um Rubreserin, dem roten Oxidationsprodukt des Eserolins, handelte (Abb. 123). Besonders groß war dieser Peak in der bei 60°C behandelten Probe. Ein direkter Zusammenhang zwischen der geringen Eserolin-Konzentration dieser Probe und dem Auftreten des unbekannten Abbauproduktes kann daher als gesichert angesehen werden.

Ingesamt zeigte sich, dass auch für Physostigmin eine Entkeimung durch Druckwechselbehandlung möglich ist, wenn die äußeren Rahmenbedingungen, insbesondere der pH-Wert der Lösung, den Stabilitätsanforderungen des Wirkstoffs entsprechen. Ist dies der Fall, sind die mit dem Druckwechselverfahren erhaltenen Ergebnisse mit denen der Sterilfiltration, als Referenzmethode für schonende Entkeimung, vergleichbar.

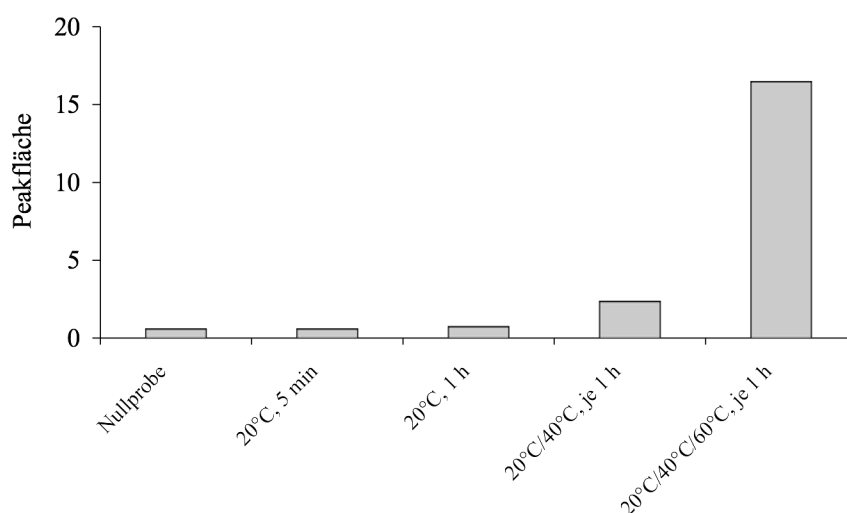


Abb. 123: Peakflächen (HPLC) des unbekannten Physostigmin-Abbauproduktes bei pH 9,0 nach Druckwechselbehandlung mit Stickstoff bei 500 bar

Das ermittelte Prozessfenster für die Temperatur (bis 40°C) erlaubt darüber hinaus den Verbleib der durch Gaskompression zugeführten Wärme im System, ohne gleichzeitig einen verstärkten Wirkstoffabbau in Kauf nehmen zu müssen.

5.3.4 PARAOXON

Die Stabilität des Phosphorsäureester Paraoxon ist vor allem von dessen hydrolytischer Resistenz abhängig. Daher ist besonders im alkalischen Milieu mit Zersetzung zu rechnen. Die in Tab. 33 dargestellten Ergebnisse der visuellen Bewertung der dampfsterilisierten bzw. sterilfiltrierten Proben sowie der unbehandelten Proben bestätigen dies. Die Farbintensität der Lösungen, als Maß für den Wirkstoffabbau, nahm mit steigendem pH-

Wert deutlich zu. Mit Ausnahme der dampfsterilisierten Proben wiesen alle Proben deselben Mediums ähnliche Eigenschaften hinsichtlich pH-Wert und Farbe auf. Die starke thermische Belastung der dampfsterilisierten Proben führte oberhalb von pH 6,9 zu einer, im Vergleich mit den anderen Proben, deutlichen Zunahme der Farbintensität.

Neben dieser ersten Bewertung der Proben erfolgte auch hier, wie bei den anderen Wirkstoffen, eine flüssigchromatographische Gehaltsbestimmung. Die HPLC-Analyse erfolgte nach Methode D mit Zubereitungen, deren Ausgangskonzentration 50 mg Paraoxon pro Liter betrug. Als zu erwartende Abbauprodukte kamen besonders das p-Nitrophenol, diverse Organophosphate wie das Diethylphosphat, sowie verschiedene Diphenole bzw. deren Chinone in Betracht [196]. Aufgrund der verwendeten Phosphatpuffer konnte nur im rein wässrigen System eine zusätzliche informative Bestimmung der durch Hydrolyse entstandenen Phosphate mittels Ionenchromatographie (Methode nicht beschrieben) erfolgen. Diese ergab bei zuvor dampfsterilisierten Proben eine Diethylphosphat-Konzentration von weniger als 1 mg/l, bei allen anderen Zubereitungen entstand kein Diethylphosphat in detektierbaren Mengen.

Tab. 33: Eigenschaften der Paraoxon-Lösungen in Abhängigkeit von der Herstellungs- und Sterilisationsmethode

Herstellungs-Methode	Puffer pH 4,5	Puffer pH 7,0	Puffer pH 9,0	destilliertes Wasser; pH 6,8
Nullprobe unbegast	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 4,5	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 6,9	gelbe, klare Lösung, pH 8,8	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 4,9
Dampfsterilisation unbegast	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 4,7	gelbe, klare Lösung, pH 6,9	stark-gelbe, klare Lösung, pH 8,9	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 5,4
Filtration unbegast	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 4,6	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 7,0	gelbe, klare Lösung, pH 8,9	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 5,0
Nullprobe begast	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 4,6	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 6,9	gelbe, klare Lösung, pH 8,9	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 5,0
Dampfsterilisation begast	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 4,7	gelbe, klare Lösung, pH 6,9	stark-gelbe, klare Lösung, pH 8,8	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 5,3
Filtration begast	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 4,6	schwach-gelbe, klare Lösung, pH 6,9	gelbe, klare Lösung, pH 8,9	sehr schwach gelbe, klare Lösung, pH 4,9

p-Nitrophenol als charakteristisches Abbauprodukt konnte in jeder Probe nachgewiesen werden; jedoch niemals in Konzentrationen über 1 mg/l [197]. In Ermangelung eines gut quantifizierbaren Abbauproduktes beschränkte sich die Analytik auf die Bestimmung des Paraoxon-Gehalt in den einzelnen Zubereitungen. Aus Abb. 124 ist ersichtlich, dass es

besonders bei der Dampfsterilisation zu deutlichen Wirkstoffverlusten kam; je nach Medium waren 80-95 % des ursprünglich vorhandenen Paraoxons abgebaut. Aber auch Adsorptionseffekte bei der Sterilfiltration verringern den Wirkstoffgehalt um mindestens 20 %. Aufgrund der Tatsache, dass Ester im alkalischen Milieu leichter hydrolysiert werden, sank der Paraoxon-Gehalt mit steigendem pH-Wert unabhängig von der Art der Probenbehandlung. Leider konnte anhand der gewählten Analytik keine konkrete Aussage über den Verbleib des abgebauten Paraoxons getroffen werden, da die Abbauprodukte zu polar für die verwendete Säule waren und somit nur den Einspritzpeak beeinflussten.

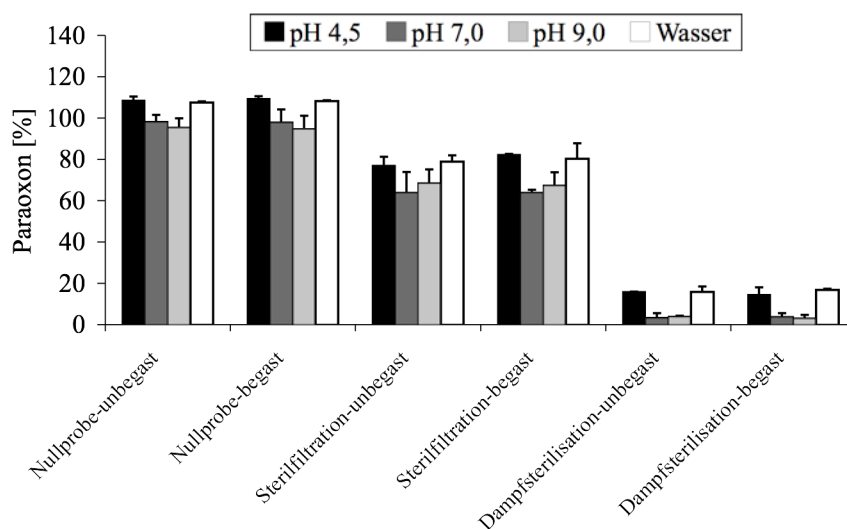


Abb. 124: Prozentualer Paraoxon-Gehalt nach konventioneller Sterilisation bezogen auf die Einwaage (\bar{x} + halbe Variationsbreite; n=2)

Da Paraoxon nicht oxidationsempfindlich ist, traten keine Unterschiede zwischen stickstoffbegaster und -unbegaster Probe auf. Daher konnte auf eine Schutzatmosphäre bei der Behandlung im Druckwechselautoklav verzichtet werden, was den apparativen Aufwand deutlich reduzierte. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in Abb. 125 dargestellt. Auch hier war bei steigendem pH-Wert ein verstärkter Abbau zu erkennen. Der Wirkstoffverlust im Bereich der niedrigen pH-Werte beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass der hohe Druck die Löslichkeit des Paraoxons im Stickstoff erhöht und somit beim Entspannen Teile mit der Gasphase entweichen. Da an dieser Stelle nicht mit toxischen Abbauprodukten zu rechnen ist, könnte eine Überdosierung bei der Herstellung der Lösung Abhilfe schaffen.

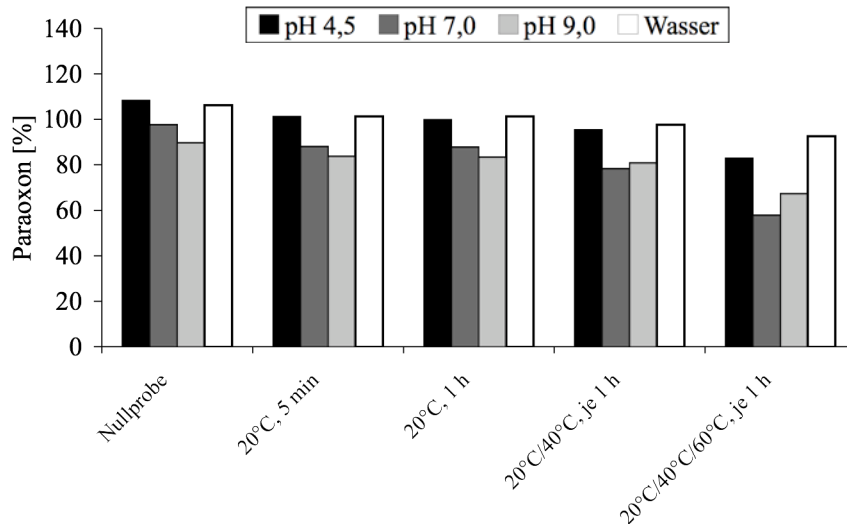


Abb. 125: Prozentualer Paraoxon-Gehalt nach Druckwechselbehandlung mit Stickstoff bei 500 bar bezogen auf die Einwaage

5.3.5 HUMANINSULIN

Der Einfluss des Druckwechselverfahrens auf die Stabilität von Proteinen wurde stellvertretend an Humaninsulin, eines der am häufigsten therapeutisch eingesetzten Proteine, untersucht. Die strukturelle Beschreibung von Proteinen erfolgt auf vier Organisationsebenen: der Primärstruktur, welche die Aminosäuresequenz der Peptidkette(n) darstellt; der Sekundärstruktur als lokale räumliche Anordnung der Polypeptidkette; der Tertiärstruktur als Makrokonformation des gesamten Polypeptids und der Quartärstruktur als räumliche Anordnung bei aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzten Proteinen [25]. Große Unterschiede zwischen den beschriebenen Organisationsebenen bestehen auch hinsichtlich der vorherrschenden chemischen Bindungen. Die Primärstruktur ist ausschließlich durch kovalente Bindungen charakterisiert, während die Sekundär- und Tertiärstruktur hauptsächlich nicht-kovalente Bindungen aufweisen. Im Detail handelt es sich hierbei um Wasserstoffbrückenbindungen sowie um hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten ist eine erste Abschätzung der zu erwartenden Druckstabilität möglich. Dabei ist eine Zerstörung der kovalenten Bindungen auszuschließen, da diese bei Drücken bis zu 15.000 bar stabil sind. Irreversible Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur sind oberhalb von 2.000-3.000 bar zu erwarten [177]. Aus Stabilitätsuntersuchungen an Insulinproben mittels FT-IR-Spektroskopie ist bekannt, dass Drücke bis 300 bar keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur ausüben [198]. Die nach Druckbehandlung erzeugten Spektren entsprachen dabei denen bei 1 bar aufgenommenen.

Ein wesentlich stärkerer Einfluss auf die Proteinstruktur ist durch den pH-Wert des Mediums zu erwarten. Dessen Veränderung führt durch die unterschiedlich aziden bzw. basischen Reste der Aminosäuren zu einer Veränderung der elektrostatischen Wechselwirkungen und damit verbunden zu einer direkten Beeinflussung der Proteinstruktur. Besonders hohe pH-Werte (> 11) führen zu einer raschen Protein-Denaturierung. Demgegenüber führen niedrige pH-Werte bis pH 2 zu keiner Veränderung der natürlichen Faltung des Insulin-Monomers [190]. Die vorliegenden Untersuchungen wurden im neutralen bzw. euhydrischen pH-Bereich durchgeführt (Tab. 34). Die beobachteten pH-Wert-Veränderungen im Verlauf des Druckwechselprozesses lassen keine eindeutige Tendenz erkennen.

Tab. 34: pH-Werte der unterschiedlich behandelten Insulin-Proben

Probe	Actrapid® (N ₂)	Actrapid® (N ₂ O)	Insulin-Lilly (N ₂)	Insulin-Lilly (N ₂ O)
Nullprobe	7,7	7,4	7,2	7,0
20°C, 5 min	7,8	7,8	7,0	7,3
20°C, 1 h	8,0	8,0	7,1	7,6
20°C/40°C, je 1 h	7,7	8,0	7,4	7,3
20°C/40°C/60°C, je 1 h	7,8	7,9	7,0	7,4

Der Insulin-Gehalt der unterschiedlich behandelten Proben wurde zunächst mittels HPLC bestimmt (Abb. 126). Eventuell auftretende Abbauprodukte, wie das ebenfalls biologisch aktive Desamido-Insulin konnten durch die verwendete Methode erfasst werden [199, 200]. Alle Chromatogramme wiesen einen symmetrischen Insulin-Peak ohne Schulterbildung und mit nur schwach ausgeprägtem Tailing auf. Durch den niedrigen pH-Wert des Fließmittels wurde sichergestellt, dass eventuell vorhandene Dimere, Tetramere oder Hexamere des Insulins in Monomere dissoziiert vorlagen. Der ermittelte Insulin-Gehalt lag bei allen Proben zwischen 90 und 98 %. Eine Desamidierung des C-terminalen Asparagins der A-Kette konnte nicht beobachtet werden, auch andere Abbauprodukte, wie kovalent gebundene Insulin-Aggregate, traten in keinem Fall auf. Bezogen auf den Gehalt der Nullproben war ein maximaler Wirkstoffverlust von 6 % zu beobachten. Sowohl Stickstoff als auch Distickstoffoxid scheinen daher für die Druckwechselbehandlung wässriger Insulin-Zubereitungen geeignet zu sein. Der überkritische Zustand des Distickstoffoxids bei Prozesstemperaturen $> 37^{\circ}\text{C}$ hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Insulininstabilität, wie der Vergleich mit den 20°C-Proben bestätigte. Ebenso waren keine Stabilitätsunterschiede zwischen dem Fertigarzneimittel Actrapid® und der frisch hergestellten Insulin-Lösung zu

beobachten. Die bei ansonsten qualitativ gleicher Zusammensetzung in Actrapid® zusätzlich enthaltenen Substanzen Glycerol (Kryoprotektans) und m-Kresol (Konservierungsmittel) besitzen demnach keinen Einfluss auf die Insulin-Stabilität.

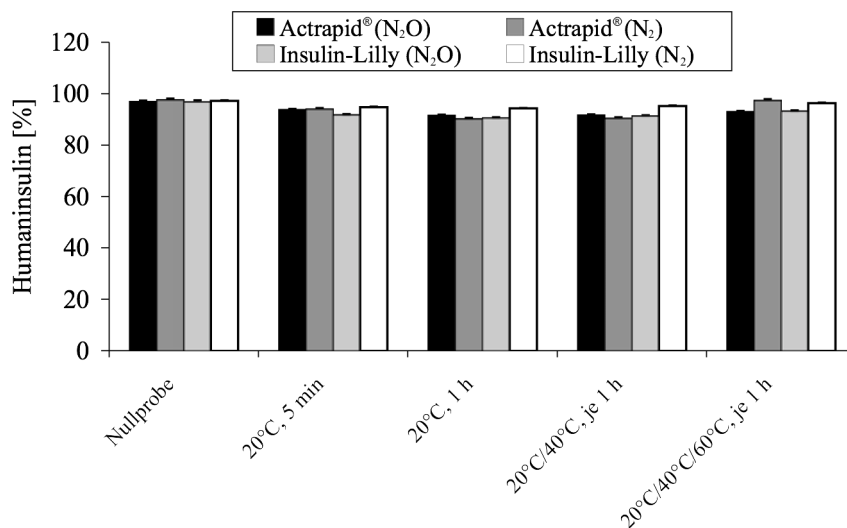


Abb. 126: Prozentualer Humaninsulin-Gehalt nach Druckwechselbehandlung bei 500 bar bezogen auf die angegebene Konzentration (Actrapid®) bzw. die Einwaage ($\bar{x} + s$; $n=6$)

Neben der flüssigchromatographischen Gehaltsbestimmung wurden von allen Proben UV/VIS-Spektren im Wellenlängenbereich von 190-300 nm aufgenommen. Die Spektren der Actrapid®-Proben waren bestimmt durch den hohen Absorptionskoeffizienten des enthaltenen m-Kresols; sie entsprechen denen des reinen m-Kresols (Abb. 127 A-I und B-I). Die mit Distickstoffoxid behandelten Proben wiesen mit steigender Prozesszeit und -temperatur eine deutliche Abnahme der Absorption auf. Grund hierfür ist vermutlich ein langsamer Konzentrationsausgleich des m-Kresols zwischen der wässrigen und der Distickstoffoxidphase, wobei das m-Kresol aus der wässrigen Phase extrahiert und während der Entspannung mit der Gasphase an die Atmosphäre abgegeben wurde. Die Spektren der stickstoffbehandelten Actrapid®-Proben zeigten dagegen kaum Veränderungen; ein Substanzverlust an m-Kresol war hier nur in geringem Umfang bei den 60 und 180 min-Proben zu beobachten. Die Spektren der Insulin-Lilly-Lösungen, welche das Absorptionsspektrum des Humaninsulins darstellen, wiesen unabhängig von der Art der Behandlung nur geringfügige Unterschiede auf (Abb. 127 A-II und B-II). Eine eindeutige Tendenz war dabei nicht zu erkennen. Die beobachteten Unterschiede sind vermutlich auf Messungenauigkeiten zurückzuführen. Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen können damit bestätigt werden. Aussagen zur Stabilität der Sekundärstruktur im Druckwechselprozess waren jedoch auch hier nicht möglich. Dagegen konnte die Stabilität der Primärstruktur mithilfe beider Methoden bestätigt werden.

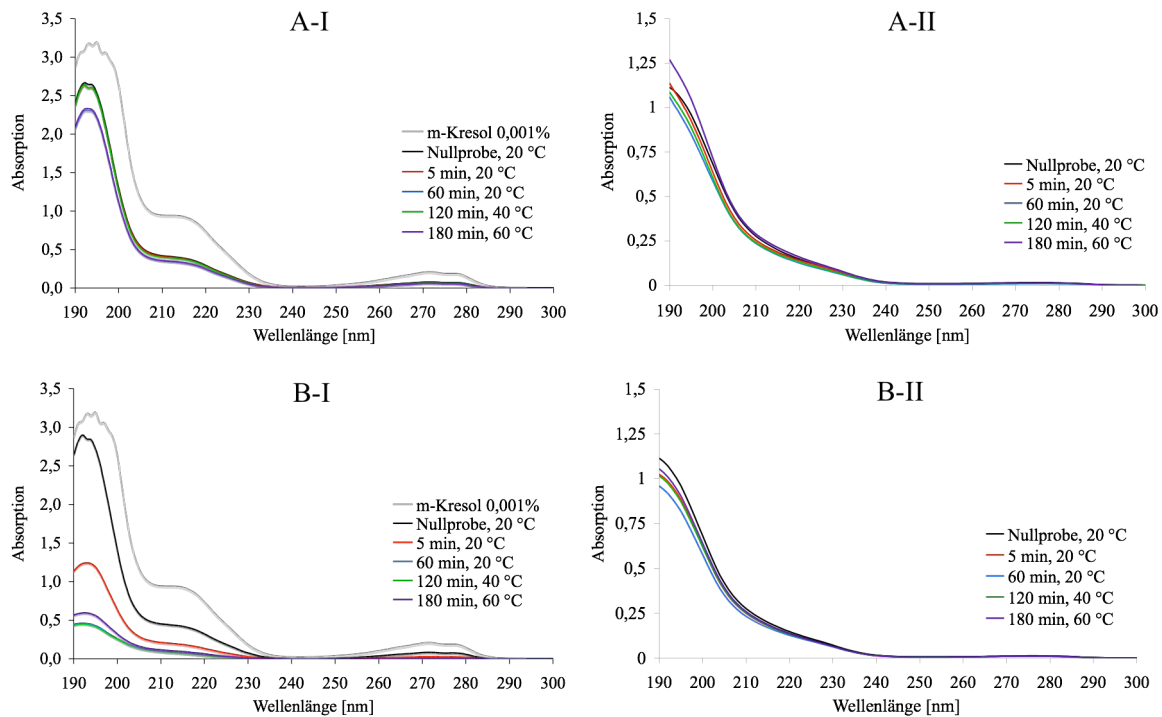


Abb. 127: UV/VIS-Spektren wässriger Insulin-Lösungen vor und nach der Druckwechselbehandlung bei 500 bar. A: Stickstoff; B: Distickstoffoxid; I: Actrapid® (Verdünnung 1:500); II: Insulin-Lilly-Lösungen (Verdünnung 1:50)

Um ausschließen zu können, dass die Druckwechselbehandlung wässriger Insulin-Lösungen eine Amyloid-Bildung begünstigt, wie es mehrfach bei druckbehandelten Insulin-Proben beobachtet wurde [201, 202], war es notwendig, genaue Aussagen zur Stabilität der Sekundärstruktur zu treffen. Etablierte Methoden zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen sind die NMR-Spektroskopie, die FT-IR-Spektroskopie (teilweise mit zirkular polarisiertem Infrarot-Licht) und die Zirkulardichroismus-Spektroskopie [202, 203]. Aufgrund der geringen Insulin-Konzentration war eine direkte Bestimmung der Proben mit den beiden erstgenannten Methoden nicht möglich. Die seit einigen Jahrzehnten etablierte Methode der Zirkulardichroismus-Spektroskopie erlaubte dagegen die gewünschte in-situ Bestimmung [204]. Das Messprinzip dieser chiroptischen Methode beruht darauf, dass optisch aktive Substanzen unterschiedliche Absorptionskoeffizienten für rechts und links zirkular polarisiertes Licht aufweisen. Die Messgröße ist dabei die Differenz dieser beiden unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten, angegeben als molarer Zirkulardichroismus $\Delta\epsilon$. Die hohe Absorptionsrate des m-Kresols im verwendeten Wellenbereich verhinderte jedoch eine Auswertung der Actrapid®-Proben mit dieser Methode, so dass stellvertretend für alle Insulin-Proben nur die Insulin-Lilly-Lösungen auf eine mögliche Veränderung der Sekundärstruktur im Druckwechselprozess untersucht werden konnten. Die Vermessung der Proben erfolgte

direkt nach der Druckwechselbehandlung sowie nach 3-monatiger Lagerung im Kühlschrank bei 6-8°C. Bei der Methodenentwicklung war besonders der hohe Absorptionskoeffizient vorhandener α -Helices und β -Faltblattstrukturen bei Wellenlängen unter 205 nm problematisch. Die messtechnische Erfassung der Absorption in diesem Wellenlängenbereich erforderte eine 1:5 Verdünnung der Proben, was eine schlechtere Erfassbarkeit der bei Wellenlängen oberhalb von 205 nm absorbierenden Strukturen zur Folge hatte. Die Auswertung der direkt nach der Druckwechselbehandlung aufgenommenen Spektren (Abb. 128 A-I und B-I) ergab einen relativ geringen Informationsgehalt der bei 200-205 nm erhaltenen Daten, so dass bei der Nachuntersuchung nach drei Monaten zugunsten einer Glättung der Kurven im Bereich von 205-300 nm auf eine Verdünnung der Proben verzichtet wurde (Abb. 128 A-II und B-II). Messungen bei Wellenlängen unter 200 nm waren aufgrund der apparativen Gegebenheiten leider nicht möglich. Die vorhandenen Sekundärstrukturen absorbieren Licht bis zu einer Wellenlänge von ca. 240 nm, Veränderungen oberhalb dieser Wellenlänge deuten auf Veränderung in der Tertiärstruktur des Proteins hin.

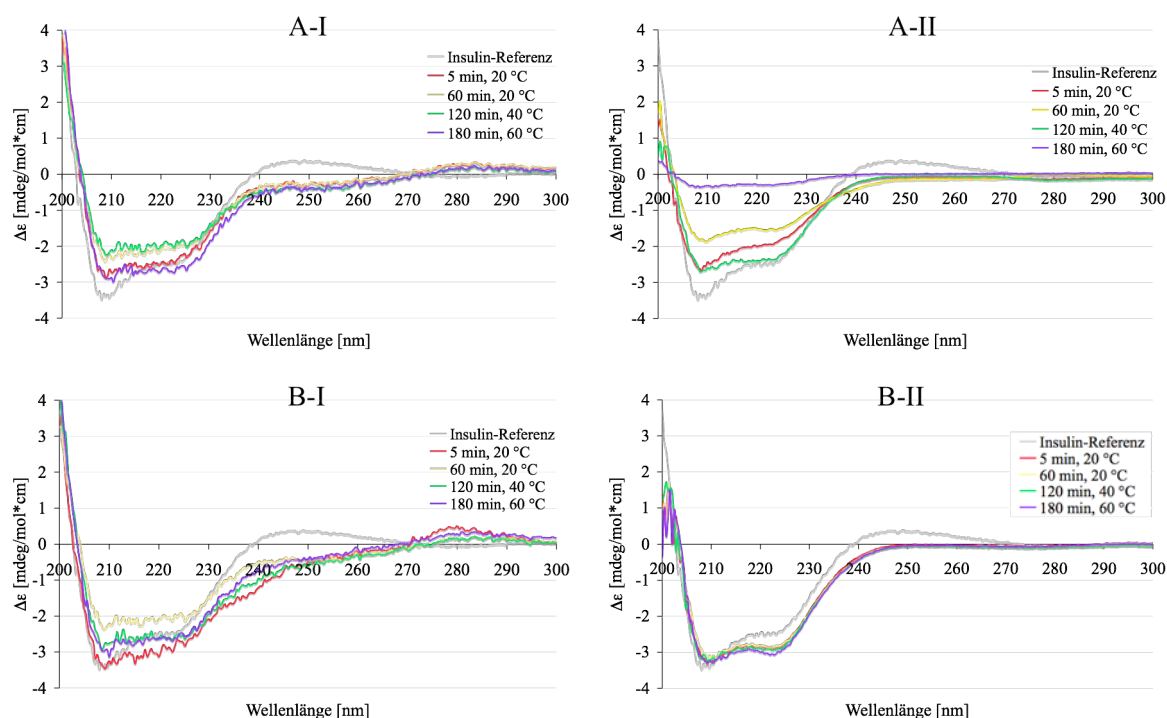


Abb. 128: CD-Spektren im fernen UV-Bereich wässriger Insulin-Lilly-Lösungen vor und nach der Druckwechselbehandlung bei 500 bar. A: Stickstoff; B: Distickstoffoxid; I: direkt nach der Druckwechselbehandlung (Verdünnung 1:5); II: nach 3 Monaten (unverdünnt, gelagert bei 6-8°C)

Die Veränderung der Absorptionsspektren im Bereich von 205-240 nm deuten, wie bereits von Melberg et al. [205] beschrieben, auf einen unterschiedlichen Gehalt an Insulin-Monomeren, -Dimeren und -Hexameren hin. Eine deutliche Zunahme an β -Faltblatt-

strukturen, erkennbar an einer verstärkten Absorption im Bereich von 210-220 nm, konnte bei keiner Probe beobachtet werden. Da aggregiertes Insulin im Gegensatz zu nativem Insulin einen besonders hohen Anteil an parallelen β -Faltblättern, bei gleichzeitig konstantem Anteil antiparalleler β -Faltblätter, aufweist [198], kann das Vorhandensein amyloider Strukturen in den untersuchten Proben ausgeschlossen werden. Die besonders starke Abnahme der Absorptionsintensität der Stickstoffbehandelten Proben nach drei Monaten Lagerung konnte nicht vollständig geklärt werden, jedoch war auffällig, dass sich bei diesen Proben ein deutlicher weißer Niederschlag gebildet hatte, welcher sich auch durch den Zusatz von 1M Salzsäure-Lösung nicht auflösen ließ. Darüber hinaus war auch nur bei diesen Proben ein deutlicher Temperatureinfluss erkennbar, wobei dieser zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen führte. Demnach wirkt sich eine Prozesstemperatur von 40°C günstiger für die Insulin-Stabilität aus als 20°C. Die übrigen Proben wiesen nur geringfügige Veränderungen im betrachteten Absorptionsbereich auf; ein Einfluss des Druckwechselverfahrens auf die Stabilität der Sekundär- und Tertiärstruktur ist daher zwar nicht vollständig auszuschließen, jedoch im Fall des untersuchten Distickstoffoxides von so geringem Ausmaß, dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um eine abschließende Aussage treffen zu können. Der Einsatz dieses Prozessgases scheint aber unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse durchaus denkbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entkeimung pharmazeutischer Zubereitungen erfolgt häufig durch thermische Verfahren. Diese sind aufgrund einer kontinuierlichen apparativen Weiterentwicklung in den vergangenen Jahrzehnten in der Anwendung sehr sicher geworden und die thermische Belastung des zu entkeimenden Gutes konnte, z.B. durch ein optimiertes Temperatur-Zeit-Regime, auf ein Minimum reduziert werden. Dennoch sind viele Wirkstoffe aufgrund ihrer geringen thermischen Stabilität diesen Verfahren nicht zugänglich. Daher gab es in der Vergangenheit verschiedene Bemühungen, alternative, nicht-thermische Verfahren mit vergleichbarer Sicherheit zu entwickeln. Mit der vorliegenden Arbeit zum Druckwechselverfahren soll ein Beitrag zu diesem Entwicklungsprozess geleistet werden.

In umfangreichen Vorversuchen wurden zunächst verschiedene Eigenschaften der beispielhaft ausgewählten Mikroorganismen bestimmt. Neben Form und Größe der Zellen zur Berechnung der Zelloberfläche und des Zellvolumens wurden deren mechanische Eigenschaften mittels AFM-Messungen und die thermischen Eigenschaften anhand von DSC-Untersuchungen charakterisiert. Insgesamt wurden neun verschiedene Spezies betrachtet (*B. atropheus*, *B. pumilus*, *C. sporogenes*, *G. stearothermophilus*, *S. aureus*, *B. diminuta*, *P. aeruginosa*, *A. niger* und *C. albicans*), wobei der Schwerpunkt auf dem grampositiven Keim *B. atropheus* und dem gramnegativen Keim *B. diminuta*, als Vertreter der jeweiligen Gruppe, lag. Zur Größenbestimmung der Mikroorganismenzellen kam neben den üblichen mikroskopischen Verfahren (Lichtmikroskopie, REM) auch die Laserdiffraktometrie zum Einsatz. Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden stimmten weitgehend überein, so dass die Laserdiffraktometrie als schnelles und durch den hohen Stichprobenumfang sehr aussagekräftiges Verfahren zur Größenbestimmung von Mikroorganismen zu empfehlen ist. Die durch DSC-Messungen an vegetativen Zellen von *B. atropheus*, *B. pumilus*, *G. stearothermophilus*, *S. aureus*, *B. diminuta* *P. aeruginosa* und *C. albicans* erhaltenen Thermogramme wiesen insgesamt ein sehr ähnliches Profil auf. Im Temperaturbereich von 60-80°C waren, bis auf eine Ausnahme, mindestens zwei endotherme Phasenübergänge zu erkennen, die aus der Denaturierung der Bakterien-Ribosomen bzw. deren Untereinheiten resultierten. Aus der Lage der Peaks im Thermogramm konnte für die Zellen von *G. stearothermophilus* die geringste und für *B. diminuta* Zellen die höchste Thermosensitivität dieser Zellbestandteile abgeleitet werden. Die übrigen untersuchten Mikroorganismen wiesen keine deutlichen Unterschiede in ihrem thermischen Verhalten auf. Die Ergebnisse der an *B. atropheus*, *B. diminuta* und

A. niger durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Messungen überraschten, da für *B. diminuta*, als Vertreter gramnegativer Bakterien, ein tendenziell höheres E-Modul bestimmt wurde als für den grampositiven Keim *B. atropheus*. Die höchste mechanische Festigkeit wiesen jedoch erwartungsgemäß die Zellen des ebenfalls untersuchten Pilzes *A. niger* auf.

Für die Druckwechselversuche kamen zwei verschiedene Hochdruckautoklaven zum Einsatz. Wesentlichster Unterschied zwischen beiden Geräten war die apparative Umsetzung der für die Druckerzeugung notwendigen Gaseinleitung. Am Premex-Autoklaven erfolgte diese in den Kopfraum der Druckkammer, während im Parr-Autoklaven das Gas direkt in die zu behandelnde Flüssigkeit geleitet wurde. Als Prozessgase wurden Stickstoff, Distickstoffoxid sowie Mischungen aus beiden Gasen verwendet. REM-Untersuchungen an druckwechselbehandelten Mikroorganismen und die optische Dichte (OD_{600}) der Proben bestätigten den angenommenen Zerstörungsmechanismus; die spontane Entspannung der mit Gas beladenen Keimsuspensionen führt infolge des Ausgasens zu einem Zerplatzen der Zellen. Die Quantifizierung der Keimzahlreduktion erfolgte mit dem Spatelplattenverfahren. Parallel dazu wurde mittels Live/Dead-Färbung der Anteil toter, nicht zerstörter Zellen bestimmt. Zusätzliche toxische Effekte waren besonders bei Distickstoffoxid zu beobachten und ursächlich für dessen hohe Effektivität. Die Verwendung von Stickstoff führte hingegen nur in wenigen Fällen zu einem erhöhten Anteil an toten, intakten Zellen. Insgesamt wurde das Absterbeverhalten von Mikroorganismen im Druckwechselverfahren an sieben Vertretern aus den Gruppen der grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie an zwei Pilzen bei 500 bar und 25°C mit den Prozessgasen Stickstoff und Distickstoffoxid untersucht. Mit Stickstoff wurden dabei Reduktionsraten zwischen 0,03 und 2,5 Zehnerpotenzen erzielt; durch die Verwendung von Distickstoffoxid konnten die Reduktionsraten auf Werte zwischen 1,2 und 6,8 deutlich erhöht werden. Auffällig war, dass bei sonst steigenden Reduktionsraten mit Distickstoffoxid das Ansprechverhalten von *C. sporogenes* auf den Druckwechselprozess unabhängig vom verwendeten Gas konstant blieb. Dies deutete auf eine ausschließlich mechanische Zerstörung der Zellen hin. Da es sich in diesem Fall um den einzigen untersuchten obligat anaeroben Keim handelte, wurde für den toxischen Einfluss des Distickstoffoxids auf die übrigen Mikroorganismen eine Störung der Zellatmung vermutet. DSC-Untersuchungen an druckwechselbehandelten *B. diminuta* Zellen ließen darüber hinaus auf eine Störung der Protein-Biosynthese schließen. Insgesamt war das Ausmaß der Keiminaktivierung stark von der Art der Mikroorganismen abhängig; eine

Tendenz war jedoch nicht zu erkennen. Ein Einfluss des Druckes und damit verbunden der Gelöstgasmenge war im untersuchten Bereich von 200-500 bar nur bei den Stickstoff-Versuchen zu beobachten, wobei die Zunahme der Keimzahlreduktion bei einer Druckerhöhung von 400 auf 500 bar überproportional hoch war. Darüber hinaus konnte durch mehrfach aufeinander folgende Druckwechsel eine Steigerung der Gesamtreduktion erzielt werden. Trotz der angestrebten nicht-thermischen Prozessführung wurde auch der Einfluss der Temperatur auf die maximal erreichbare Reduktionsrate untersucht. Die in einem sehr engen Temperaturbereich von 10-40°C durchgeführten Versuche zeigten, dass eine von 25°C abweichende Prozesstemperatur die Effektivität des Verfahrens deutlich erhöht. So wurde mit der Absenkung der Prozesstemperatur auf 10°C eine Erhöhung der Keimzahlreduktion um bis zu 500 % erreicht. Mit einer Prozesstemperatur von 40°C in Kombination mit Distickstoffoxid als Prozessgas konnte sogar bei einer Ausgangskeimzahl von 10^8 KBE/ml Sterilität erzielt werden. Einen geringeren Einfluss auf den Reduktionserfolg hatten das verwendete Probenvolumen und die Druckhaltezeit. Bei den Stickstoff-Versuchen war bereits nach 5 min die maximale Reduktionsrate erreicht. Bedingt durch den zusätzlichen toxischen Effekt des Distickstoffoxids konnte bis zu einer Behandlungsdauer von 60 min eine Zeitabhängigkeit der Reduktionsrate beobachtet werden. Eine über diese Zeitspanne hinausgehende Druckbelastung führte zu keiner weiteren Erhöhung der Reduktionsrate. Zudem beeinflusste das Alter der Zellen das Absterbeverhalten. Besonders ältere Zellen erwiesen sich gegenüber dem Druckwechselverfahren als deutlich unempfindlicher. Der Einfluss der Ausgangskeimzahl wurde an *B. atropheus* und *B. diminuta* Kulturen verschiedener Konzentrationen (10^5 bzw. 10^8 KBE/ml) untersucht. Eine konzentrationsabhängige Keimzahlreduktion konnte nur bei *B. atropheus* Kulturen beobachtet werden. Die Reduktionsraten der *B. diminuta* Kulturen waren dagegen ausschließlich vom verwendeten Prozessgas abhängig. Mit Distickstoffoxid konnte daher eine Sterilisation der geringer konzentrierten Keimsuspension erzielt werden. Ein DMSO-Zusatz führte sowohl bei *B. atropheus* als auch bei *B. diminuta* Keimen zu einer deutlichen Verringerung der Reduktionsrate. Als Ursache hierfür wurde eine Fluidisierung der Zellmembranen angenommen. Die damit einhergehende Erhöhung der Zellelastizität führte vermutlich zu einer Verringerung des Schädigungspotentials des expandierenden Gases während der Entspannung. Ein 10 %iger Natriumlactat-Zusatz als rigidisierendes Agens führte zu unterschiedlichen Effekten. Ein protektiver Einfluss war bei *B. atropheus* Zellen zu beobachten, während *B. diminuta* Zellen empfindlicher auf das Druckwechselverfahren reagierten. Bei der praktischen Anwendung des Druckwechsel-

verfahrens sollte daher der Einfluss der verwendeten Wirk- und Hilfsstoffe auf die zu entkeimende Zubereitung berücksichtigt werden. Eine Schwierigkeit bei der abschließenden Bewertung des Druckwechselerfahrens lag in der Interpretation kleiner Restkeimzahlen. Da im Allgemeinen mit sehr hohen Ausgangskeimzahlen gearbeitet wurde, um die für eine sichere Entkeimung notwendigen hohen Reduktionsraten darstellen zu können, war die Gefahr einer Verunreinigung durch ungenügend behandelte Teilmengen zu berücksichtigen. So genügt ein Volumen von 7 µl mit einer Keimzahl von 10^8 KBE/ml, um 70 ml (übliche Probemenge) einer keimfreien Flüssigkeit mit 10^4 KBE/ml zu belasten. Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen an wässrigen Lösungen von L-Epinephrin, D-Penicillamin, Physostigmin und Paraoxon belegten, dass die Entkeimung im Druckwechselautoklav hinsichtlich der Belastung des Sterilisationsgutes mit der Sterilfiltration vergleichbare Ergebnisse liefert. Als wichtigster Parameter für die Stabilität von flüssigen Arzneistoffzubereitungen konnte neben dem verwendeten Sterilisationsverfahren der pH-Wert der Lösung bestätigt werden. Der Einfluss einer Schutzgasatmosphäre war im Vergleich dazu deutlich weniger ausgeprägt. Zwischen begasten und unbegasten Proben wurden nur geringe Unterschiede gefunden. Beschleunigte Haltbarkeitstests an wässrigen L-Epinephrin-Zubereitungen zeigten, dass die Druckwechselbehandlung keinen negativen Einfluss auf die Langzeitstabilität der Arzneistoffzubereitungen ausübt. Dem in den vergangenen Jahren stark gestiegenen Anteil von Peptid-Wirkstoffen in der Pharmazie wurde mit den Stabilitätsuntersuchungen an Humaninsulin Rechnung getragen. Diese meist flüssigen Zubereitungen stellen hohe Anforderungen an die mikrobielle Reinheit, sind jedoch zu thermolabil für eine Dampfsterilisation. Bei dieser Wirkstoffgruppe könnte die Druckwechseltechnologie daher einen wesentlichen Beitrag zur schonenden Entkeimung und damit zur Arzneimittelsicherheit leisten. Die druckwechselbehandelten Humaninsulin-Lösungen wurden mittels HPLC und Zirkulardichroismus analysiert. Unterschiedlich stark ausgeprägte Veränderungen in der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Proteinmoleküle ließen eine abschließende Bewertung jedoch nicht zu.

7 SUMMARY

The sterilization of pharmaceutical formulations often involves thermal treatment. Continuous improvement of the required technical equipment in the past decades led to safe sterilization procedures. Furthermore, optimized temperature/time regimes have reduced the thermal stress of formulations to be sterilized. Many active pharmaceutical ingredients (APIs) cannot be sterilized by heat sterilization due to their low thermal stability. The need for safe non-thermal sterilization procedures led to the development of various novel cold sterilization methods. The aim of this work was to verify the suitability of the pressure change technology as a gentle cold sterilization procedure.

In preliminary experiments different properties of the chosen model microorganisms were determined. Besides form and size of the cells (for calculation of cell surface and cell volume) their elastic properties were characterised by AFM and the thermal characteristics by DSC. Overall, nine different species of bacteria, yeasts and moulds (*B. atropheus*, *B. pumilus*, *C. sporogenes*, *G. stearothermophilus*, *S. aureus*, *B. diminuta*, *P. aeruginosa*, *A. niger* und *C. albicans*) were analysed, particularly *B. atropheus* (Gram-positive) and *B. diminuta* (Gram-negative). Microscopic methods (light microscopy, REM) but also laser diffraction were used to determine the size of the microorganism cells. The results of these methods did not differ significantly, so that laser diffraction is recommended as a powerful method for size determination of microorganism cells. Thermal analysis of the vegetative form of *B. atropheus*, *B. pumilus*, *G. stearothermophilus*, *S. aureus*, *B. diminuta*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* revealed no significant differences between the thermograms. In a temperature range between 60 and 80°C two or more endothermal phase transitions were observed (except for *C. albicans*), indicating thermal denaturation of the bacterial ribosomes and their subunits. With ribosomes of *B. diminuta* the highest thermosensitivity was detected, with ribosomes of *G. stearothermophilus* the lowest. The elastic properties of the cell wall of *B. atropheus*, *B. diminuta* and *A. niger* were investigated by atomic force microscopy. The results surprised, as with *B. diminuta*, a Gram-negative bacterium, a higher elastic modulus was determined than with the Gram-positive germ *B. atropheus*. As expected, the cells of *A. niger* showed the highest mechanical stability.

For the pressure change treatment two high pressure autoclaves with a different technical realisation of the gas supply for pressurization were used. In the Premex autoclave the gas was directed into the head space of the pressure chamber, while in the Parr autoclave the

gas was fed directly into the liquid to be treated. Nitrogen (type 5.0), nitrous oxide (medical grade) as well as mixtures of both gases were used. The mechanism of cell destruction was analysed by scanning electron microscopy and optical density (OD₆₀₀). The following mechanism was confirmed: an increase in the intracellular volume and pressure by the released gas after the expansion step ultimately leads to a disruption of the cell. The sterilizing effect was evaluated by determining the number of viable cells after pressure change treatment compared to that initially added. The number of viable cells was determined by quantification of the number of colonies grown on agar medium. In addition, the Live/Dead assay was used to quantify the fraction of dead cells. Toxic effects were observed particularly with nitrous oxide as process gas supporting its efficacy, whereas microorganism cultures treated with nitrogen scarcely showed increased numbers of dead cells. Altogether, the reduction rates of nine microorganism species (Gram-negative and Gram-positive bacteria, yeasts, moulds) were analysed with nitrogen and nitrous oxide as process gas, respectively, at 500 bar and 25°C. With nitrogen reduction rates between 0.03 and 2.5 orders of magnitude were achieved. A significant increase of the reduction rates could be observed with nitrous oxide (1.2- 6.8 orders of magnitude). Surprisingly, the reduction rates of *C. sporogenes* did not depend on the type of gas. The death of these microorganisms is considered to be caused mainly by mechanical rupture of the cell wall by the released gas. Hence, for the toxic effect of non-fastidious anaerobes a disturbance of the cell respiration was postulated. In addition, thermal analysis of *B. diminuta* cultures treated by pressure change reveal a disturbance of protein biosynthesis. Altogether the reduction rate was strongly dependent on the type of microorganism; however, no general tendency was observed. An influence of the applied pressure in the examined range of 200-500 bar was recognizable only with nitrogen as process gas. Especially a pressure increase from 400 to 500 bar led to a significant increase of the reduction rate. By repeating the pressure change treatment an increase of the reduction rate was achieved. In spite of the overall goal of a non-thermal sterilization process, the influence of the temperature was also examined. All experiments were carried out within a temperature range of 10-40°C. Temperatures above or below 25°C were most effective. A decrease of the temperature to 10°C increased the reduction rate up to 5 fold. At 40°C sterility was achieved with nitrous oxide as process gas. The sample volume and the treatment time had a less pronounced influence. With nitrogen a treatment time of only 5 min already led to the maximum reduction rate. Because of the toxic effect of nitrous oxide a time-dependent reduction rate up to a treatment time of 60 min was observed. Moreover, the age of the cells influenced the efficacy of the process;

older cells were less sensitive. The influence of the bioburden was investigated by variation of the cell concentration (10^5 and 10^8 cfu/ml). Only with *B. atropheus* cultures a dependence of the cell concentration was observed. A constant reduction rate of 5-6 orders of magnitude with *B. diminuta* led to sterilization of the culture with the lower cell concentration.

DMSO, a widely known penetration enhancer, led to a decreased reduction rate with *B. atropheus* as well as with *B. diminuta* cultures. It may be concluded that a fluidisation of the cell membranes increases the tolerance against disruption by the released gas. Sodium lactate, known for the rigidisation of cell membranes, caused different effects; cell protection as well as cell sensitisation was observed. Hence, employing the pressure change technology the influence of the APIs and the excipients on the formulation to be sterilised should always be considered.

The problem with the final evaluation of the pressure change technology was the interpretation of small viable cell concentrations after sterilization. A contamination of the sterilized medium by untreated medium could not be ruled out. For instance, a volume of 7 μ l of a microorganism culture with 10^8 cfu/ml can create a bioburden of 10^4 cfu/ml in 70 ml of sterile medium (= sample volume).

Chemical stability was confirmed with all investigated drugs (L-Epinephrine, D-Penicillamine, Eserine and Paraoxon). The pH was the most important parameter with regard to the stability of the aqueous drug solutions. The influence of a protective gas atmosphere was comparatively low. The accelerated stability tests of different L-Epinephrine solutions showed no negative influence on their shelf-life. The increasing number of biologicals for therapeutical use was accounted for by stability testing of human insulin. Insulin formulations are usually intended for parenteral application, moreover their thermo-sensitivity prohibit heat sterilization. The pressure change technology could provide an essential contribution to the gentle sterilization of these formulations. Insulin chemical stability was confirmed by HPLC analysis. However, the results of the circular dichroism experiments revealed a partial change in the secondary and tertiary structure. However, the differently pronounced changes in the molecule structure did not allow a final conclusion.

ANHANG: TEMPERATUR- UND DRUCKVERLAUF IM DRUCKWECHSELPROZESS**PROZESSGAS STICKSTOFF****Tab. A - 1: *B. atropheus*, Versuch 1, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)**

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	23	23
5 min	501	421	80	27	27
30 min	505	418	87	26	26
60 min	501	430	71	26	26
120 min	502	427	75	26	26

Tab. A - 2: *B. atropheus*, Versuch 2, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	22	22
5 min	503	440	63	28	28
30 min	503	419	84	27	27
60 min	505	431	74	26	26
120 min	504	410	94	26	26

Tab. A - 3: *B. atropheus*, Versuch 3, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min	2	1	1	27	27
5 min	504	449	55	27	27
30 min	502	446	56	27	27
60 min	501	439	62	27	27
120 min	505	441	64	27	27

Tab. A - 4: *B. atropheus*, vorgekühlte Kultur, Versuch 1, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	6	6
5 min	502	434	68	24	24
30 min	503	429	74	26	26
60 min	506	428	78	26	26
120 min	502	419	83	26	26

Tab. A - 5: *B. atropheus*, vorgekühlte Kultur, Versuch 2, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min	2	1	1	7	7
5 min	501	435	66	26	26
30 min	506	440	66	27	27
60 min	503	436	67	27	27
120 min	500	431	69	27	27

Tab. A - 6: *B. atropheus*, vorgekühlte Kultur, Versuch 3, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	7	7
5 min	505	448	57	27	27
30 min	503	447	56	27	27
60 min	506	440	66	27	27
120 min	505	436	69	27	27

Tab. A - 7: *B. pumilus*, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	25	25
5 min	512	412	100	29	28
30 min	508	373	135	24	24

Tab. A - 8: *G. stearothermophilus*, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	25	25
5 min	506	367	139	30	29
30 min	514	368	146	26	23

Tab. A - 9: *S. aureus*, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	23	23
5 min	500	420	80	31	31
30 min	504	405	99	27	26
60 min	505	423	82	27	27
120 min	503	440	63	26	25

Tab. A - 10: *C. sporogenes*, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	28	28
5 min	502	430	72	33	33
30 min	504	423	81	28	28
60 min	505	424	81	28	26
120 min	500	450	50	25	25

Tab. A - 11: *B. diminuta*, Versuch 1, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	4	3	1	27	27
5 min	501	442	59	29	29
30 min	505	443	62	27	27
60 min	506	440	66	27	27
120 min	503	434	69	27	27

Tab. A - 12: *B. diminuta*, Versuch 2, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	28	28
5 min	501	428	73	29	29
30 min	500	433	67	28	28
60 min	501	429	72	28	27
120 min	500	447	53	26	26

Tab. A - 13: *B. diminuta*, Versuch 3, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	25	25
5 min	500	439	61	27	27
30 min	501	444	57	27	27
60 min	503	438	65	26	26
120 min	500	448	52	26	25

Tab. A - 14: *P. aeruginosa*, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	26	26
5 min	500	431	69	29	28
30 min	504	433	71	27	27
60 min	504	443	61	26	26
120 min	506	429	77	26	26

Tab. A - 15: *A. niger*, 3h inkubierte Sporensuspension, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	25	25
0 min - mit rühren	1	1	0	25	25
5 min	498	346	152	28	28
30 min	504	338	166	24	22
60 min	525	356	169	29	26

Tab. A - 16: *A. niger*, 8h inkubierte Sporensuspension, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	25	25
0 min - mit rühren	1	1	0	25	25
5 min	512	376	136	30	29
30 min	510	365	145	23	21
60 min	512	377	135	26	21

Tab. A - 17: *A. niger*, 12 h inkubierte Sporensuspension, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	25	25
0 min - mit rühren	1	1	0	25	25
5 min	507	358	149	29	28
30 min	510	340	170	26	24
60 min	508	387	121	27	25

Tab. A - 18: *C. albicans*, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	26	26
5 min	501	411	90	32	32
30 min	504	406	98	28	27
60 min	507	407	100	27	26
120 min	503	429	74	26	25

Tab. A - 19: *B. atropheus*, 400 bar, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	4	4	0	24	24
5 min	400	344	56	28	27
30 min	404	348	56	26	26
60 min	402	350	52	26	26
120 min	404	348	56	26	26

Tab. A - 20: *B. atropheus*, 300 bar, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	5	4	1	23	23
5 min	306	267	39	28	27
30 min	306	270	36	26	26
60 min	304	269	35	26	26
120 min	304	259	45	26	26

Tab. A - 21: *B. atropheus*, 200 bar, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	20	20
5 min	209	184	25	27	27
30 min	207	189	18	25	25
60 min	202	183	19	25	25
120 min	205	187	18	25	25

Tab. A - 22: *B. atropheus*, 10°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	15	14
5 min	504	369	135	13	13
30 min	511	349	162	10	5

Tab. A - 23: *B. atropheus*, 25°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	30	30
5 min	516	363	153	35	34
30 min	513	362	151	24	20

Tab. A - 24: *B. atropheus*, 40°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	37	38
5 min	501	354	147	42	41
30 min	500	362	138	40	34

Tab. A - 25: *B. pumilus*, 10°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	1	1	13	13
5 min	510	368	142	13	13
30 min	503	374	129	10	8

Tab. A - 26: *B. pumilus*, 25°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	25	25
5 min	512	412	100	29	28
30 min	508	373	135	24	24

Tab. A - 27: *B. pumilus*, 40°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	38	38
5 min	490	358	132	41	41
30 min	506	420	86	40	37

Tab. A - 28: *G. stearothermophilus*, 10°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	1	1	15	14
5 min	479	356	123	19	17
30 min	516	361	155	12	9

Tab. A - 29: *G. stearothermophilus*, 25°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	25	25
5 min	506	367	139	30	29
30 min	514	368	146	26	23

Tab. A - 30: *G. stearothermophilus*, 40°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	36	37
5 min	522	370	152	44	44
30 min	509	375	134	39	37

Tab. A - 31: *A. niger*, 3h inkubierte Sporensuspension, 10°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	15	15
0 min - mit rühren	1	1	0	15	15
5 min	519	432	87	19	18
30 min	537	375	162	13	12
60 min	520	366	154	12	11

Tab. A - 32: *A. niger*, 3h inkubierte Sporensuspension, 25°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	25	25
0 min - mit rühren	1	1	0	25	25
5 min	498	346	152	28	28
30 min	504	338	166	24	22
60 min	525	356	169	29	26

Tab. A - 33: *A. niger*, 3h inkubierte Sporensuspension, 40°C, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	38	38
0 min - mit rühren	1	1	0	39	40
5 min	508	371	137	43	43
30 min	511	346	165	41	37
60 min	516	360	156	40	37

Tab. A - 34: *B. atropheus*, verminderte Ausgangskeimzahl, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.4)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	25	25
5 min	501	409	92	31	30
30 min	502	421	81	29	29
60 min	503	415	88	28	27
120 min	502	427	75	28	28

Tab. A - 35: *B. diminuta*, verminderte Ausgangskeimzahl, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.4)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	25	25
5 min	502	438	64	31	31
30 min	504	410	94	29	28
60 min	500	420	80	28	28
120 min	500	429	71	28	28

Tab. A - 36: *B. atropheus*, junge Zellen – 3,5 h, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.5)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	21	21
5 min	500	401	99	29	29
30 min	503	399	104	25	24
60 min	504	411	93	25	25
120 min	502	448	54	25	25

Tab. A - 37: *B. atropheus*, alte Zellen – 24 h, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.5)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	29	29
5 min	501	398	103	35	35
30 min	502	418	84	30	30
60 min	503	421	82	29	29
120 min	504	434	70	27	26

Tab. A - 38: *B. diminuta*, junge Zellen – 6h, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.5)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	26	26
5 min	500	398	102	26	26
30 min	501	417	84	25	25
60 min	502	420	82	25	25
120 min	500	438	62	25	25

Tab. A - 39: *B. atropheus*, alte Zellen – 36 h, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.5)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	29	29
5 min	502	391	111	33	33
30 min	500	404	96	30	30
60 min	501	411	90	29	29
120 min	500	432	68	27	27

Tab. A - 40: *B. atropheus*, Langzeitversuch, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.6)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	25	25
5 min	504	428	76	35	31
6 h	500	404	96	26	24
12 h	506	417	89	25	24

Tab. A - 41: *B. atropheus*, Langzeitversuch, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.6)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	24	24
5 min	502	410	92	34	33
6 h	504	419	85	25	25
12 h	505	410	95	25	23

Tab. A - 42: *B. atropheus*, mehrfache Komplettentspannung, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.7)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min - 1	1	1	0	23	23
30 min - 1	501	235	266	25	20
0 min - 2	1	1	0	25	25
30 min - 2	503	289	214	25	17
0 min - 3	1	1	0	25	25
30 min - 3	504	357	147	26	25
0 min - 4	2	2	0	22	22
30 min - 4	502	248	254	25	23

Tab. A - 43: *B. diminuta*, mehrfache Komplettentspannung, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.7)

Probenahme	p_{Anfang} [bar]	p_{Ende} [bar]	Δp [bar]	$\vartheta_{\text{Anfang}}$ [°C]	ϑ_{Ende} [°C]
0 min - 1	1	1	0	23	23
30 min - 1	505	263	242	27	19
0 min - 2	1	1	0	24	24
30 min - 2	502	307	195	25	19
0 min - 3	2	2	0	24	24
30 min - 3	502	342	160	26	19
0 min - 4	2	2	0	25	25
30 min - 4	505	284	221	27	22

Tab. A - 44: *B. atropheus*, Zusatz von 10 % Na-lactat, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.8)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	23	23
5 min	505	402	103	28	28
30 min	506	424	82	25	25
60 min	508	418	90	25	24
120 min	506	427	79	25	23

Tab. A - 45: *B. atropheus*, Zusatz von 20 % DMSO, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.8)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	27	27
5 min	505	418	87	30	30
30 min	508	422	86	27	26
60 min	508	420	88	27	26
120 min	504	442	62	26	26

Tab. A - 46: *B. diminuta*, Zusatz von 10 % Na-lactat, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.8)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	25	25
5 min	503	411	92	27	27
30 min	505	436	69	26	26
60 min	502	425	77	26	26
120 min	500	438	62	27	26

Tab. A - 47: *B. diminuta*, Zusatz von 20 % DMSO, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.8)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	25	25
5 min	501	415	86	28	28
30 min	505	428	77	27	27
60 min	501	433	68	26	25
120 min	502	444	58	25	25

Tab. A - 48: *B. atropheus*, vermindertes Volumen, 250 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.9)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	24	24
5 min	500	430	70	35	34
30 min	502	444	58	26	26
60 min	505	472	33	26	26

Tab. A - 49: *B. atropheus*, vermindertes Volumen, 125 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.9)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	24	24
5 min	500	453	47	35	34
30 min	500	463	37	26	26
60 min	502	462	40	26	26

Tab. A - 50: *B. diminuta*, vermindertes Volumen, 250 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.9)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	24	24
5 min	500	428	72	35	32
30 min	500	438	62	28	28
60 min	500	463	37	28	26

Tab. A - 51: *B. diminuta*, vermindertes Volumen, 125 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.9)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	24	24
5 min	500	441	59	30	30
30 min	503	461	42	27	27
60 min	502	460	42	25	25

Tab. A - 52: *B. atropheus*, 0,9 %ige NaCl-Lsg., 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.10)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	24	24
5 min	501	403	98	27	26
30 min	502	436	66	26	26
60 min	503	439	64	26	26
120 min	502	440	62	26	26

Tab. A - 53: *B. atropheus*, 5 % Aerosil, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.10)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	24	24
5 min	501	409	92	26	26
30 min	502	428	74	27	27
60 min	505	411	94	26	24
120 min	500	421	79	26	26

Tab. A - 54: *B. diminuta*, 0,9 %ige NaCl-Lsg., 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.10)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	25	25
5 min	503	411	92	27	27
30 min	505	436	69	26	26
60 min	502	425	77	26	26
120 min	500	438	62	27	26

Tab. A - 55: *B. diminuta*, 5 % Aerosil, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.10)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	25	25
5 min	501	415	86	28	28
30 min	505	428	77	27	27
60 min	501	433	68	26	25
120 min	502	444	58	25	25

Tab. A - 56: *B. atropheus*, inaktivierte Mikroorganismen, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.11)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	23	23
5 min	505	400	105	34	34
30 min	500	411	89	28	28
60 min	500	422	78	28	28
120 min	501	418	83	26	26

Tab. A - 57: *B. diminuta*, inaktivierte Mikroorganismen, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.1.11)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	16	16
5 min	500	403	97	29	29
30 min	501	400	101	25	25
60 min	504	428	76	25	25
120 min	502	417	85	25	25

PROZESSGAS DISTICKSTOFFMONOXID

Tab. A - 58: *B. atropheus*, Versuch 1, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	25	25
5 min	500	280	220	35	35
30 min	502	268	234	33	33
60 min	501	257	244	33	31
120 min	500	261	239	31	30

Tab. A - 59: *B. atropheus*, Versuch 2, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	4	4	0	24	24
5 min	500	236	264	35	35
30 min	499	250	249	32	32
60 min	503	256	247	31	30
120 min	500	267	233	30	30

Tab. A - 60: *B. atropheus*, Versuch 3, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	23	23
5 min	501	269	232	34	33
30 min	505	254	251	31	30
60 min	501	289	212	31	30
120 min	504	276	228	30	30

Tab. A - 61: *B. pumilus*, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.2.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	26	26
5 min	494	235	259	29	26
30 min	490	225	265	25	22

Tab. A - 62: *G. stearotherophilus*, 250 ml, Premex (vgl. Kap. 4.3.2.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	26	26
5 min	486	180	306	30	27
30 min	463	155	308	24	22

Tab. A - 63: *S. aureus*, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	19	19
5 min	499	280	219	32	30
30 min	500	291	209	29	29
60 min	508	295	213	28	28
120 min	502	270	232	28	27

Tab. A - 64: *C. sporogenes*, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	27	27
5 min	500	286	214	35	35
30 min	503	264	239	35	34
60 min	502	254	248	35	32
120 min	503	247	256	31	31

Tab. A - 65: *B. diminuta*, 1. Versuch, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	20	20
5 min	501	242	259	36	36
30 min	504	225	279	34	33
60 min	500	224	276	34	31
120 min	501	290	211	32	30

Tab. A - 66: *B. diminuta*, 2. Versuch, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	21	21
5 min	505	284	221	36	35
30 min	502	256	246	30	30
60 min	504	223	281	30	30
120 min	502	232	270	29	29

Tab. A - 67: *B. diminuta*, 3. Versuch, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	24	24
5 min	500	285	215	35	34
30 min	501	278	223	32	31
60 min	506	266	240	31	30
120 min	500	257	243	30	29

Tab. A - 68: *P. aeruginosa*, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	23	23
5 min	500	254	246	35	35
30 min	506	241	265	34	33
60 min	502	240	262	32	31
120 min	501	287	214	32	31

Tab. A - 69: *A. niger*, 3 h inkubierte Sporensuspension, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	25	25
0 min - mit rühren	1	1	0	25	25
5 min	498	173	325	28	25
30 min	503	155	348	27	23
60 min	486	180	306	27	24

Tab. A - 70: *A. niger*, 8 h inkubierte Sporensuspension, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	25	25
0 min - mit rühren	1	1	0	25	25
5 min	502	221	281	35	35
30 min	503	230	273	30	29
60 min	502	240	262	28	27

Tab. A - 71: *A. niger*, 12 h inkubierte Sporensuspension, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min - ohne rühren	1	1	0	25	25
0 min - mit rühren	1	1	0	25	25
5 min	505	248	257	35	34
30 min	503	240	263	30	29
60 min	502	249	253	28	26

Tab. A - 72: *C. albicans*, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.1.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	27	27
5 min	503	264	239	35	35
30 min	502	253	249	34	34
60 min	505	273	232	33	32
120 min	504	242	262	31	30

Tab. A - 73: *B. atropheus*, 400 bar, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	22	22
5 min	400	226	174	35	35
30 min	405	214	191	33	33
60 min	409	205	204	32	31
120 min	408	203	205	31	30

Tab. A - 74: *B. atropheus*, 300 bar, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	23	23
5 min	308	150	158	35	35
30 min	305	154	151	33	33
60 min	302	158	144	32	31
120 min	303	147	156	31	30

Tab. A - 75: *B. atropheus*, 200 bar, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	3	3	0	20	20
5 min	202	132	70	35	35
30 min	201	121	80	30	30
60 min	203	115	88	30	30
120 min	200	116	84	29	29

Tab. A - 76: *B. atropheus*, 40°C, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	35	35
5 min	504	300	204	43	42
30 min	501	289	212	43	42
60 min	502	277	225	40	40
120 min	500	250	250	40	39

Tab. A - 77: *B. diminuta*, 40°C, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	29	29
5 min	502	309	193	41	41
30 min	501	283	218	40	40
60 min	505	309	196	40	40
120 min	504	270	234	40	40

Tab. A - 78: *B. atropheus*, verminderte Ausgangskeimzahl, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.4)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	22	22
5 min	500	250	250	33	33
30 min	500	268	232	32	32
60 min	501	235	266	32	32
120 min	500	201	299	30	28

Tab. A - 79: *B. diminuta*, verminderte Ausgangskeimzahl, 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.2.4)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	24	24
5 min	501	271	230	38	37
30 min	504	223	281	33	33
60 min	501	221	280	32	31
120 min	503	207	296	31	30

PROZESSGAS STICKSTOFF/DISTICKSTOFFMONOXID**Tab. A - 80: *B. atropheus*, 50 bar, N₂O; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.3)**

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	24	24
5 min	50	48	2	26	26
30 min	50	48	2	25	25
60 min	51	49	2	25	25
120 min	50	48	2	25	25

Tab. A - 81: *B. atropheus*, 50 bar N₂O/ 500 bar N₂; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	22	22
60 min	504	387	117	27	27

Tab. A - 82: *B. diminuta*, 50 bar, N₂O; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	24	24
5 min	50	48	2	27	27
30 min	51	49	2	26	26
60 min	50	48	2	25	25
120 min	50	48	2	25	25

Tab. A - 83: *B. diminuta*, 50 bar N₂O/ 500 bar N₂; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	25	25
60 min	502	407	95	27	27

RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN**Tab. A - 84: *B. atropheus*, N₂; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.4.1)**

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	28	28
30 min	505	422	83	35	35

Tab. A - 85: *B. atropheus*, N₂O; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.4.1)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	29	29
30 min	500	274	226	35	35

Tab. A - 86: *B. diminuta*, N₂; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.4.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	30	30
30 min	504	427	77	32	31

Tab. A - 87: *B. diminuta*, N₂O; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.4.2)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	27	27
30 min	500	318	182	35	35

Tab. A - 88: *C. albicans*, N₂; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.4.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	25	25
30 min	500	425	75	27	27

Tab. A - 89: *C. albicans*, N₂O; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.4.3)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	2	2	0	25	25
30 min	503	328	175	35	35

DSC-UNTERSUCHUNGEN**Tab. A - 90: *B. diminuta*, N₂; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.5)**

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	27	26
5 min	500	406	94	30	30
30 min	504	398	106	26	26
60 min	506	378	128	26	25
120 min	503	408	95	26	25

Tab. A - 91: *B. diminuta*, N₂O; 500 ml, Parr (vgl. Kap. 4.3.5)

Probenahme	p _{Anfang} [bar]	p _{Ende} [bar]	Δp [bar]	ϑ _{Anfang} [°C]	ϑ _{Ende} [°C]
0 min	1	1	0	27	27
5 min	500	228	272	35	35
30 min	503	186	317	34	34
60 min	501	191	310	33	32
120 min	500	239	261	33	32

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Whitman W. B., Coleman D. C., Wiebe W. J.
Prokaryotes: The unseen majority.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 6578-6583 (1998)
- [2] Kramer A., Assadian O.
Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2008)
- [3] Rieth M.
Pharma-Betriebshygiene.
Swiss Pharm. 30: 9-17 (2008)
- [4] Europäisches Arzneibuch 6.0.
Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (2008)
- [5] Nguyen H. T. T., Corry J. E. L., Miles C. A.
Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic *Campylobacters*.
Appl. Environ. Microbiol. 72: 908-913 (2006)
- [6] Zhao L., Schaefer D., Xu H., Modi S. J., LaCourse W. R., Marten M. R.
Elastic properties of the cell wall of *Aspergillus nidulans* studied with atomic force microscopy.
Biotechnol. Prog. 21: 292-299 (2005)
- [7] Reitz M.
Bakterien als Vielzeller.
Pharm. Ind. 70: 690-692 (2008)
- [8] Cypionka H.
Grundlagen der Mikrobiologie.
Springer Verlag, Berlin (1999)
- [9] Madigan M. T., Martinko J. M.
Brock - Biology of Microorganisms.
Pearson Education, Upper Saddle River (2006)
- [10] Steuer W., Lutz-Dettinger U., Schubert F.
Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1998)
- [11] Beveridge T. J.
Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial cell wall.
Int. Rev. Cytol. 72: 229-317 (1981)
- [12] Blount P., Moe P. C.
Bacterial mechanosensitiv channels: integrating physiology, structure and function.
Trends Microbiol. 7: 420-424 (1999)

-
- [13] Kempf B., Bremer E.
Stress responses of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: Uptake and synthesis of osmoprotectans.
J. Biosci. 23: 447-455 (1998)
- [14] Lehner S. J., Furkert F., Müller B. W.
Keimwachstum in Zuckerlösungen.
Pharm. Ind. 56: 911-914 (1994)
- [15] Thwaites J. J., Mendelson N. H.
Mechanical behaviour of bacterial cell walls.
Adv. Microbial Physiol. 32: 174-222 (1991)
- [16] Reinhard E., Kreis W., Rimpler H.
Pharmazeutische Biologie.
Wiss.Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1995)
- [17] Graham L. L., Beveridge T. J.
Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall.
J. Bacteriol. 176: 1413-1421 (1993)
- [18] Hug C., Stieneker F.
Endotoxine - Die unterschätzte Gefahr.
Swiss Med 26: 14-15 (2004)
- [19] Shih Y.-L., Rothfield L.
The bacterial cytoskeleton.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70: 729-754 (2006)
- [20] Harold F. M.
Bacterial morphogenesis: Learning how cells make cells.
Curr. Opin. Microbiol. 100: 591-595 (2007)
- [21] Harold F. M.
Force and compliance: Rethinking morphogenesis in walled cells.
Fungal Genet. Biol. 37: 271-282 (2002)
- [22] Koch A. L.
The three-for-one model for gram-negative wall growth: A problem and a possible solution.
FEMS Microbiol. Lett. 162: 127-134 (1998)
- [23] Koch A. L.
The surface stress theory for the case of *Escherichia coli*: The paradoxes of gram-negative growth.
Res. Microbiol. 141: 119-130 (1990)
- [24] Koch A. L.
The surface stress theory of microbial morphogenesis.
Adv. Microbial Physiol. 24: 301-366 (1983)

-
- [25] Voet D., Voet J. G.
Biochemie.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1994)
- [26] Touhami A., Nysten B., Dufrêne Y. F.
Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy.
Langmuir 19: 4539-4543 (2003)
- [27] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
Williams & Wilkins, Baltimore (1994)
- [28] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
Springer Verlag, New York (2005)
- [29] Ahimou F., Denis F. A., Touhami A., Dufrêne Y. F.
Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy.
Langmuir 18: 9937-9941 (2002)
- [30] Radmacher M.
Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy.
Methods Cell Biol. 83: 347-372 (2007)
- [31] Francius G., Domenech O., Mingeot-Leclercq M. P., Dufrêne Y. F.
Direct observation of *Staphylococcus aureus* cell wall digestion by lysostaphin.
J. Bacteriol. 190: 7904-7909 (2008)
- [32] Radmacher M.
Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM.
IEEE Eng. Med. Biol. 3: 47-57 (1997)
- [33] Carl P., Schillers H.
Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: Data acquisition and processing.
Eur. J. Physiol. 457: 551-559 (2008)
- [34] Yao X., Walter J., Burke S., Stewart S., Jericho M. H., Pink D., Hunter R., Beveridge T. J.
Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria.
Colloids Surf., B 23: 213-230 (2002)
- [35] Dufrêne Y. F.
Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology.
J. Bacteriol. 184: 5205-5213 (2002)
- [36] Boonaert C. J. P., Rouxhet P. G., Dufrêne Y. F.
Surface properties of microbial cells probed at the nanometre scale with atomic force microscopy.
Surf. Interface Anal. 30: 32-35 (2000)
- [37] Kasas S., Ikai A.
A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging.
Biophys. J. 68: 1678-1680 (1995)

-
- [38] Dufrêne Y. F.
Refining our perception of bacterial surfaces with the atomic force microscope.
J. Bacteriol. 186: 3283-3285 (2004)
- [39] Boonaert C. J. P., Toniazzo V., Mustin C., Dufrêne Y. F., Rouxhet P. G.
Deformation of *Lactococcus lactis* surface in atomic force microscopy study.
Colloids Surf., B 23: 201-211 (2002)
- [40] Touhami A., Jericho M. H., Boyd J. M., Beveridge T. J.
Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* pili by using atomic force microscopy.
J. Bacteriol. 188: 370-377 (2006)
- [41] van der Mei H. C., Busscher H. J., Bos R., de Vries J.; Boonaert C. J. P.,
Dufrêne Y. F.
Direct probing by atomic force microscopy of the cell surface softness of a
fibrillated and nonfibrillated oral streptococcal strain.
Biophys. J. 78: 2668-2674 (2000)
- [42] Dufrêne Y. F., Boonaert C. J. P., Gerin P. A., Asther M., Rouxhet P. G.
Direct probing of the surface ultrastructure and molecular interactions of dormant
and germinating spores of *Phanerochaete chrysosporium*.
J. Bacteriol. 181: 5350-5354 (1999)
- [43] van der Aa B. C., Michel R. M., Asther M., Zamora M. T., Rouxhet P. G.,
Dufrêne Y. F.
Stretching cell surface macromolecules by atomic force microscopy.
Langmuir 17: 3116-3119 (2001)
- [44] Touhami A., Jericho M. H., Beveridge T. J.
Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*.
J. Bacteriol. 186: 3286-3295 (2004)
- [45] Chada V. G. R., Sanstad E. A., Wang R., Driks A.
Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces.
J. Bacteriol. 185: 6255-6261 (2003)
- [46] Gad M., Ikai A.
Method for immobilizing microbial cells on gel surface for dynamic AFM studies.
Biophys. J. 69: 2226-2233 (1995)
- [47] Arnoldi M., Fritz M., Bäuerlein E., Radmacher M., Sackmann E., Boulbitch A.
Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy.
Phys. Rev. E 62: 1034-1044 (2000)
- [48] Arnoldi M., Kacher C. M., Bäuerlein E., Radmacher M., Fritz M.
Elastic properties of the cell wall of *Magnetospirillum gryphiswaldense* investigated
by atomic force microscopy.
Appl. Phys. A 66: 613-617 (1998)

-
- [49] Zhao L., Schaefer D., Marten M. R.
Assessment of elasticity and topography of *Aspergillus nidulans* spores via atomic force microscopy.
Appl. Environ. Microbiol. 71: 955-960 (2005)
- [50] Schär-Zammaretti P., Ubbink J.
The cell wall of lactic acid bacteria: Surface constituents and macromolecular conformations.
Biophys. J. 85: 4076-4092 (2003)
- [51] Velegol S. B., Pardi S., Li X., Velegol D., Logan B. E.
AFM imaging artifacts due to bacterial cell height and AFM tip geometry.
Langmuir 19: 851-857 (2003)
- [52] Müller D. J., Amrein M., Engel A.
Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy.
J. Struct. Biol. 119: 172-188 (1997)
- [53] Doktycz M. J., Sullivan C. J., Hoyt P. R., Pelletier D. A., Wu S., Allison D. P.
AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces.
Ultramicroscopy 97: 209-216 (2003)
- [54] Camesano T. A., Natan M. J., Logan B. E.
Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy.
Langmuir 16: 4563-4572 (2000)
- [55] Microbiology Manual.
Merck KGaA, Darmstadt (2000)
- [56] Bast E.
Mikrobiologische Methoden.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (2001)
- [57] Vaija J., Lagaude A., Ghommidh C.
Evaluation of image analysis and laser granulometry for microbial cell sizing.
Ant. van Leeuwenhoek 67: 139-149 (1995)
- [58] Teipel U.
Problems in characterizing transparent particles by laser light diffraction spectrometry.
Chem. Eng. Technol. 25: 13-21 (2002)
- [59] Molina-Garcia A. D., de Pieri L. A., Ludlow I., Waites W. M., de la Torre J. G., Harding S. E.
Comparison of quasielastic light scattering and laser diffractometry as non-destructive probes into the light structure of *Bacillus sphaericus* spores produced at different temperatures.
Appl. Environ. Microbiol. 62: 1699-1704 (1996)

-
- [60] Kanerva H., Kiesvaara J., Muttonen E., Yliruusi J.
Use of laser light diffraction in determining the size distributions of different shaped particles.
Pharm. Ind. 55: 849-853 (1993)
- [61] Neumann A. M., Kramer H. J. M.
A comparative study of various size distribution measurement systems.
Part. Part. Syst. Charact. 19: 17-27 (2002)
- [62] Koch A. L.
Estimation of size of bacteria by low-angle light-scattering measurements: Theory.
J. Microbiol. Methods 5: 221-235 (1986)
- [63] Belliveau B. H., Beaman T. C., Pankratz H. S., Gerhardt P.
Heat killing of bacterial spores analyzed by differential scanning calorimetry.
J. Bacteriol. 174: 4463-4474 (1992)
- [64] Lee J., Kaletunç G.
Evaluation of the heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry.
Appl. Environ. Microbiol. 68: 5379-5386 (2002)
- [65] Lee J., Kaletunç G.
Calorimetric determination of inactivation parameters of micro-organisms.
J. Appl. Microbiol. 93: 178-189 (2002)
- [66] Mohácsi-Farkas C., Farkas J., Mészáros L., Reichart O., Andrassy E.
Thermal denaturation of bacterial cells examined by differential scanning calorimetry.
J. Therm. Anal. Calorim. 57: 409-414 (1999)
- [67] Bayles D. O., Tunick M. H., Foglia T. A., Miller A. J.
Cold shock and its effect on ribosomes and thermal tolerance in *Listeria monocytogenes*.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 4351-4355 (2000)
- [68] Miles C. A.
Relating cell killing to inactivation of critical components.
Appl. Environ. Microbiol. 72: 914-917 (2006)
- [69] Lepock J. R., Frey H. E., Inniss W. E.
Thermal analysis of bacteria by differential scanning calorimetry: Relationship of protein denaturation in situ to maximum growth temperature.
Biochim. Biophys. Acta 1055: 19-26 (1990)
- [70] Lepock J. R.
Measurement of protein stability and protein denaturation in cells using differential scanning calorimetry.
Methods 35: 117-125 (2005)

-
- [71] Mackey B. M., Miles C. A., Parsons S. E., Seymour D. A.
Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli*
examined by differential scanning calorimetry
J. Gen. Microbiol. 137: 2361-2374 (1991)
- [72] Ramos-Sanchez M. C., Orduña-Domingo A., Rodriguez-Torres A., Martin-Gil F. J.,
Martin-Gil J.
Thermal analysis of lipopolysaccharides from *Brucella* and other gram-negative
bacteria.
Thermochim. Acta 191: 299-305 (1991)
- [73] Rodriguez-Torres A., Ramos-Sanchez M. C., Orduña-Domingo A., Martin-Gil F. J.,
Martin-Gil J.
Differential scanning calorimetry investigations on LPS and free lipids A of the
bacterial cell wall.
Res. Microbiol. 144: 729-740 (1993)
- [74] Miles C. A., Mackey B. M., Parsons S. E.
Differential scanning calorimetry of bacteria.
J. Gen. Microbiol. 132: 939-952 (1986)
- [75] Tunick M. H., Bayles D. O., Novak J. S.
DSC analysis of foodborne bacteria.
J. Therm. Anal. Calorim. 83: 23-26 (2006)
- [76] Smith A. E., Moxham K. E., Middelberg A. P. J.
On uniquely determining cell-wall material properties with the compression
experiment
Chem. Eng. Sci. 53: 3913-3922 (1998)
- [77] Mashmouhy H., Zhang Z., Thomas C. R.
Micromanipulation measurement of the mechanical properties of baker's yeast cells.
Biotechnol. Tech. 12: 925-929 (1998)
- [78] Prechtel K., Bausch A. R., Marchi-Artzner V., Kantlehner M., Kessler H.,
Merkel R.
Dynamic force spectroscopy to probe adhesion strength of living cells.
Phys. Rev. Lett. 89: 1011-1014 (2002)
- [79] Smith A. E., Zhang Z., Thomas C. R., Moxham K. E., Middelberg A. P. J.
The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*.
Appl. Biol. Sci. 97: 9871-9874 (2000)
- [80] Smith A. E., Moxham K. E., Middelberg A. P. J.
Wall material properties of yeast cells. Part II. Analysis.
Chem. Eng. Sci. 55: 2043-2053 (2000)
- [81] Yao X., Jericho M., Pink D., Beveridge T.
Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force
microscopy.
J. Bacteriol. 181: 6865-6875 (1999)

-
- [82] Xu W., Mulhern P. J., Blackford B. L., Jericho M. H., Firtel M., Beveridge T. J. Modeling and measuring the elastic properties of an archeal surface, the sheath of *Methanospirillum hungatei*, and the implication for methane production. *J. Bacteriol.* 178: 3106-3112 (1996)
- [83] Steele A., Goddard D. T., Beech I. B. An atomic force microscopy study of the biodeterioration of stainless steel in the presence of bacterial biofilms. *Int. Biodet. Biodeg.* 35-46 (1994)
- [84] Boca B. M., Pretorius E., Gochin R., Chapoullie R., Apostolides Z. An overview of the validation approach for moist heat sterilization, part I. *Pharm. Technol.* 9: 62-70 (2002)
- [85] Hose K., Pfeiffer M. Validierbarkeit des F₀-Konzeptes bei Dampfsterilisationsverfahren mit Sporen von *Bacillus stearothermophilus*. *Pharm. Ind.* 64: 384-389 (2002)
- [86] Bliem R., Nowak W. G. Inaktivierung von Mikroorganismen durch Sterilisation, Desinfektion oder Pasteurisierung. *Pharm. Ind.* 66: 470-477 (2004)
- [87] Mann A., Kiefer M., Leuenberger H. Thermal sterilization of heat-sensitive products using high-temperature short-time sterilization. *J. Pharm. Sci.* 90: 275-287 (2001)
- [88] Gaillard S., Leguérinel I., Savy N., Mafart P. Quantifying the combined effects of the heating time, the temperature and the recovery medium pH on the regrowth lag time of *Bacillus cereus* spores after a heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 53-58 (2005)
- [89] Volland C., Wolff M., Kissel T. The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Controlled Release* 31: 293-305 (1994)
- [90] von Woedtke T., Jülich W.-D., Thal S., Diederich M., Stieber M., Kindel E. Antimicrobial efficacy and potential application of a newly developed plasma-based ultraviolet irradiation facility. *J. Hospital Infect.* 55: 204-211 (2003)
- [91] Bässler H.-J. Die Biodekontamination von Isolatoren in der pharmazeutischen Produktion mit Wasserstoffperoxid-Dampf in niedriger Konzentration. *Swiss Pharma 4-S*: 31-36 (1995)

-
- [92] Mau T., Hartmann V., Langguth P., Häusler H.
Sterilisation von Oberflächen unter Einsatz von Wasserstoffperoxid in der Dampfphase.
Pharm. Ind. 63: 1191-1196 (2001)
- [93] Zheng J. Y., Bosch H. W.
Sterile filtration of NanoCrystal™ drug formulations.
Drug Dev. Ind. Pharm. 23: 1087-1093 (1997)
- [94] Jahnke M.
Vorbereitung und Durchführung einer Validierung des aseptischen Herstellungsverfahrens (Media Fill).
Pharm. Ind. 66: 594-600 (2004)
- [95] Stärk A.
Media Fill bei mehrstufigen Prozessen.
Pharm. Ind. 66: 588-593 (2004)
- [96] Jornitz M. W., Agalloco J. P., Akers J. E., Madsen R. E., Meltzer T. H.
Filter integrity testing in liquid applications, revisited
Pharm. Technol. 10: 34-50 (2001)
- [97] Jornitz M. W., Meltzer T. H.
The mechanics of removing organisms by filtration: The importance of theory.
Pharm. Technol. Europe 5: 22-27 (2002)
- [98] Spilimbergo S., Elvassore N., Bertucco A.
Microbial inactivation by high pressure.
J. Supercrit. Fluids 22: 55-63 (2002)
- [99] Butz P., Ries J., Traugott U., Weber H., Ludwig H.
Hochdruckinaktivierung von Bakterien und Bakteriensporen.
Pharm. Ind. 52: 487-491 (1990)
- [100] Sojka B., Ludwig H.
Pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores.
Pharm. Ind. 56: 660-663 (1994)
- [101] Sojka B., Ludwig H.
Effects of rapid pressure changes on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores.
Pharm. Ind. 59: 436-438 (1997)
- [102] Merkulow N., Eicher R., Ludwig H.
Pressure inactivation of fungal spores in aqueous model solutions and in real food systems.
High Pressure Res. 19: 253-262 (2000)
- [103] Butz P., Ludwig H.
Hochdruckinaktivierung von Hefen und Schimmelpilzen.
Pharm. Ind. 53: 584-586 (1991)

-
- [104] Mañas P., Mackey B. M.
Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: Relationship with cell death.
Appl. Environ. Microbiol. 70: 1545-1554 (2004)
- [105] Sojka B., Ludwig H.
Pressure sensitivity of *Bacillus subtilis* spores that survived previous high pressure treatments.
Pharm. Ind. 57: 251-252 (1995)
- [106] Ludwig H.
Cell biology and high pressure: Applications and risks.
Biochim. Biophys. Acta 1595: 390-391 (2002)
- [107] Pereda J., Ferragut V., Quevedo J. M., Guamis B., Trujillo A. J.
Heat damaged evaluation in ultra-high pressure homogenized milk.
Food Hydrocolloids 23: 1974-1979 (2009)
- [108] Geciova J., Bury D., Jelen P.
Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review.
Int. Dairy J. 12: 541-553 (2002)
- [109] Sizer C. E., Balasubramaniam V. M.
New intervention processes for minimally processed juices.
Food Technol. 53: 64-67 (1999)
- [110] Beltran E., Pla R., Yuste J., Mor-Mur M.
Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: Role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values.
Meat Sci. 64: 19-25 (2003)
- [111] Kaiser C. S., Römpf H., Schmidt P. C.
Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide.
Pharmazie 56: 907-926 (2001)
- [112] Subramaniam B., Rajewski R. A., Snavely K.
Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide.
J. Pharm. Sci. 86: 885-890 (1997)
- [113] Tom J. W., Debenedetti P.
Particle formation with supercritical fluids - A review.
J. Aerosol. Sci. 22: 555-584 (1991)
- [114] Palakodaty S., York P.
Phase behavioral effects on particle formation processes using supercritical fluids.
Pharm. Res. 16: 976-985 (1999)
- [115] Spilimbergo S., Bertucco A., Basso G., Bertoloni G.
Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO₂ treatment.
Biotechnol. Bioeng. 92: 447-451 (2005)

-
- [116] Dillow A. K., Dehghani F., Hrkach J. S., Foster N. R., Langer R.
Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 10344-10348 (1999)
- [117] Spilimbergo S., Bertucco A.
Non-thermal bacteria inactivation with dense CO₂.
Biotechnol. Bioeng. 84: 627-638 (2003)
- [118] Kamihira M., Taniguchi M., Kobayashi T.
Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide.
Agric. Biol. Chem. 51: 407-412 (1987)
- [119] Garcia-Gonzalez L., Geeraerd A. H., Spilimbergo S., Elst K., Van Ginneken L.,
Debevere J., Van Impe J. F., Devlieghere F.
High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the
present and the future.
Int. J. Food Microbiol. 117: 1-28 (2007)
- [120] Fraser D.
Bursting bacteria by release of gas pressure.
Nature 4236: 33-34 (1951)
- [121] Nakamura K., Enomoto A., Fukushima H., Nagai K., Hakoda M.
Disruption of microbial cells by the flash discharge of high-pressure carbon dioxide.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1297-1301 (1994)
- [122] Hao H., Wu M., Chen Y., Tang J., Wu Q.
Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation.
Colloids Surf., B 33: 151-156 (2004)
- [123] Xin Q., Zhang X., Li Z., Lei L.
Sterilization of oil-field re-injection water using combination treatment of pulsed
electric field and ultrasound.
Ultrason. Sonochem. 16: 1-3 (2009)
- [124] Brujan E. A., Ikeda T., Matsumoto Y.
On the pressure of cavitation bubbles.
Exp. Thermal Fluid Sci. 32: 1188-1191 (2008)
- [125] Rae J., Ashokkumar M., Eulaerts O., von Sonntag C., Reisse J., Grieser F.
Estimation of ultrasound induced cavitation bubble temperatures in aqueous
solutions.
Ultrason. Sonochem. 12: 325-329 (2005)
- [126] Drakopoulou S., Terzakis S., Fountoulakis M. S., Mantzavinos D., Manios T.
Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in
secondary treated municipal wastewater.
Ultrason. Sonochem. 16: 629-634 (2009)
- [127] Süss W.
Zur Keimabtötung durch Ultraschall.
Pharmazie 27: 615 (1972)

-
- [128] Zenker M.
Ultraschall kombinierte Prozessführung bei der Pasteurisierung und Sterilisierung flüssiger Lebensmittel.
Dissertation, Technische Universität Berlin (2004)
- [129] Süß W., Hanke H.
Der Einfluß von Ultraschall auf demineralisiertes Wasser in Abhängigkeit von der Natur der anwesenden Gase.
Pharm. Zentralhalle 106: 86-90 (1967)
- [130] Grahl T., Märkl H.
Killing of microorganisms by pulsed electric fields.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 148-157 (1996)
- [131] Knorr D., Engel K.-H., Vogel R., Kochte-Clemens B., Eisenbrand G.
Statement on the treatment of food using a pulsed electric field.
Mol. Nutr. Food Res. 52: 1539-1542 (2008)
- [132] Spilimbergo S., Dehghani F., Bertucco A., Foster N. R.
Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO₂ at low temperature.
Biotechnol. Bioeng. 82: 118-125 (2003)
- [133] Gómez-López V. M., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F.
Pulsed light for food decontamination: A review.
Trends Food Sci. Technol. 18: 464-473 (2007)
- [134] Huffman D. E., Slifko T. R., Salisbury K., Rose J. B.
Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light.
Wat. Res. 34: 2491-2498 (2000)
- [135] Enomoto A., Nakamura K., Nagai K., Hashimoto T., Hakoda M.
Inactivation of food microorganisms by high-pressure carbon dioxide treatment with or without explosive decompression.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 61: 1133-1137 (1997)
- [136] Beutekamp S., Harting P.
Experimental determination and analysis of high pressure adsorption data of pure gases and gas mixtures.
Adsorption 8: 255-269 (2002)
- [137] Herbst A., Germanus J., Harting P.
Contactless weighing up to high pressures for analysing adsorption and density of fluids.
J. Therm. Anal. Calorim. 62: 509-514 (2000)
- [138] Ustinov E. A., Do D. D., Herbst A., Staudt R., Harting P.
Modelling of gas adsorption equilibrium over a wide range of pressure: A thermodynamic approach based on equation of state.
J. Colloid Interface Sci. 250: 49-62 (2002)

-
- [139] von Solms N., Nielsen J. K., Hassager O., Rubin A., Dandekar A. Y., Andersen S. I., Stenby E. H.
Direct measurement of gas solubilities in polymers with a high-pressure microbalance.
J. Appl. Polym. Sci. 91: 1476-1488 (2004)
- [140] Mohammadi A. H., Chapoy A., Tohidi B., Richon D.
Water content measurement and modeling in the nitrogen + water system.
J. Chem. Eng. Data 50: 541-545 (2005)
- [141] Hartono A., Juliussen O., Svendsen F.
Solubility of N₂O in aqueous solution of diethylenetriamine.
J. Chem. Eng. Data 53: 2696-2700 (2008)
- [142] Kennan R. P., Pollack G. L.
Pressure dependence of the solubility of nitrogen, argon, krypton and xenon in water.
J. Chem. Phys. 93: 2724-2735 (1990)
- [143] Kierzkowska-Pawlak H., Zarzycki R.
Solubility of carbon dioxide and nitrous oxide in water + methyldiethanolamine and ethanol + methyldiethanolamine solutions.
J. Chem. Eng. Data 47: 1506-1509 (2002)
- [144] Borgstedt H. H., Gillies A. J.
Determination of the solubility of nitrous oxide in water by gas chromatography.
Anesthesiology 26: 675-678 (1965)
- [145] Gabel R. A., Schultz B.
Solubility of nitrous oxide in water, 20-80°C.
Anesthesiology 38: 75-81 (1973)
- [146] Pitzer K. S., Peiper J. C.
Thermodynamic properties of aqueous sodium chloride solutions.
J. Phys. Chem. Ref. Data 13: 1-102 (1984)
- [147] Duan Z., Møller N., Weare J. H.
A general equation of state for supercritical fluid mixtures and molecular dynamics simulation of mixture PVTX properties.
Geochim. Cosmochim. Acta 60: 1209-1216 (1996)
- [148] Sun R., Hu W., Duan Z.
Prediction of nitrogen solubility in pure water and aqueous NaCl solutions up to high temperature, pressure, and ionic strength.
J. Solution Chem. 30: 561-573 (2001)
- [149] Ross B.
Allgemeine und physikalische Chemie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1988)

-
- [150] Libicki S. B., Salmon P. M., Robertson C. R.
The effective diffusive permeability of a non reacting solute in microbial cell aggregates.
Biotechnol. Bioeng. 32: 68-85 (1988)
- [151] Borden M. A., Longo M. L.
Dissolution behavior of lipid monolayer-coated, air-filled microbubbles: Effect of lipid hydrophobic chain length.
Langmuir 18: 9225-9233 (2002)
- [152] Price W. S., Barzykin A. V., Hayamizu K., Tachiya M.
A model for diffusive transport through a spherical interface probed by pulsed-field gradient NMR.
Biophys. J. 74: 2259-2271 (1998)
- [153] Franz B., Hiller H., Müller H., Öhman H., Peters S.
1x1 der Gase.
Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf (2007)
- [154] Wiebe R., Gaddy V. L., Heins C. J.
Solubility of nitrogen in water at 25°C from 25 to 1000 atmospheres.
Ind. Eng. Chem. 24: 927-927 (1932)
- [155] Morrison T. J., Billett F.
The salting-out of non-electrolytes. Part II.* The effect of variation in non-electrolyte.
J. Chem. Soc. 3819-3822 (1952)
- [156] Arao T., Hara Y., Suzuki Y., Tamura K.
Effect of high-pressure gas on yeast growth.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1365-1371 (2005)
- [157] Fenn W. O.
Inert gas narcosis.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 117: 760-767 (1965)
- [158] Bennett P. B., Hayward A. J.
Electrolyte imbalance as the mechanism for inert gas narcosis and anaesthesia.
Nature 231: 938-939 (1967)
- [159] Sojka B., Ludwig H.
Release of dipicolinic acid and amino acids during high pressure treatment of *Bacillus subtilis* spores.
Pharm. Ind. 59: 355-359 (1997)
- [160] Bönsch K., Wecks M., Ondruschka J., Staudt R.
Effect of a new pressure change technology (PCT) on microorganisms: An innovative concept for food safety.
Chem. Eng. Technol. 30: 755-757 (2007)
- [161] Weber M. H. W., Marahiel M. A.
Bacterial cold shock responses
Sci. Progress 86: 9-75 (2003)

-
- [162] Naumann C., Brumm T., Bayerl T. M.
Phase transition behavior of single phosphatidylcholine bilayers on a solid spherical support studied by DSC, NMR and FT-IR.
Biophys. J. 63: 1314-1319 (1992)
- [163] Mentrup E., Butz P., Stricker H., Ludwig H.
Hochdrucksterilisation von Liposomen.
Pharm. Ind. 50: 363-366 (1988)
- [164] Kowalski E., Ludwig H., Tauscher B.
Hydrostatischer Hochdruck zur Sterilisation von Lebensmitteln I: Anwendung bei Pfeffer (*Piper nigrum L.*).
Dtsch. Lebensm. Rundsch. 88: 74-76 (1992)
- [165] Schreck C., Layh-Schmitt G., Ludwig H.
Inactivation of *Mycoplasma pneumoniae* by high hydrostatic pressure.
Pharm. Ind. 61: 759-762 (1999)
- [166] Gurtovenko A. A., Anwar J.
Modulating the structure and properties of cell membranes: The molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide.
J. Phys. Chem. B 111: 10453-10460 (2007)
- [167] Spilimbergo S., Mantoan D.
Stochastic modeling of *S. cerevisiae* inactivation by supercritical CO₂.
Biotechnol. Prog. 21: 1461-1465 (2005)
- [168] Ziegler A.
Medizinische Gase.
DAZ 149: 60-65 (2009)
- [169] Holleman A. F., Wiberg E.
Lehrbuch der anorganischen Chemie.
Walter de Gruyter, Berlin (1995)
- [170] Jou F.-Y., Carroll J. J., Mather A. E., Otto F. D.
The solubility of nitrous oxide in water at high temperatures and pressures.
Z. Phys. Chem. 177: 225-239 (1992)
- [171] Schirmer U.
Lachgas. Entwicklung und heutiger Stellenwert.
Anaesthesist 47: 245-255 (1998)
- [172] Warner D. S., Warner M. A.
Biologic effects of nitrous oxide.
Anesthesiology 109: 707-722 (2008)
- [173] Baden J. M., Monk S. J.
Mutagenicity and toxicity studies with high pressure nitrous oxide.
Toxicol. Lett. 7: 259-262 (1981)

-
- [174] Marquis R. E., Thom S. R., Crookshank C. A.
Interactions of helium, oxygen and nitrous oxide affecting bacterial growth.
Undersea Biomed. Res. 5: 189-198 (1978)
- [175] Spilimbergo S., Mantoan D., Dalser A.
Supercritical gases pasteurization of apple juice.
J. Supercrit. Fluids 40: 485-489 (2007)
- [176] Silva J. L., Weber G.
Pressure stability of proteins.
Annu. Rev. Phys. Chem. 44: 89-113 (1993)
- [177] Balny C.
Pressure effects on weak interactions in biological systems.
J. Phys.: Condens Matter 16: 1245-1253 (2004)
- [178] Spilimbergo S., Luca G., Elvassore N., Bertucco A.
Effect of high-pressure gases on phase behaviour of solid lipids.
J. Supercrit. Fluids 38: 289-294 (2006)
- [179] Wiegand U. K. H., Kurowski V., Katus H. A.
Die Akuttherapie des Herzstillstandes.
Internist 42: 1599-1609 (2001)
- [180] Trissel L. A.
Handbook on Injectable Drugs.
American Society of Hospital Pharmacists, Bethesda (1994)
- [181] Dolder R., Skinner F. S.
Ophthalmika.
Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1990)
- [182] Szulczewski D. H., Hong W.
Analytical profiles of drug substances - epinephrine.
Academic press, San Diego (1978)
- [183] Ammon H. P. T.
Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen.
Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1991)
- [184] Cui Z., Lockman P. R., Atwood C. S., Hsu C.-H., Gupte A., Allen D. D.,
Mumper R. J.
Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in
Alzheimer's and other CNS diseases.
Eur. J. Pharm. Biopharm. 59: 263-272 (2005)
- [185] Chiu C. C., Grady L. T.
Analytical profiles of drug substances.
Academic press, San Diego (1981)

-
- [186] Lee H. S., Kim K., Kim J. H., Do K. S., Lee S. K.
Simultaneous determination of parathion and metabolites in serum by HPLC with column switching.
Chromatographia 44: 473-476 (1997)
- [187] Brange J., Andersen L., Laursen E. D., Meyn G., Rasmussen E.
Toward understanding insulin fibrillation.
J. Pharm. Sci. 86: 517-525 (1997)
- [188] Dische F. E., Wernstedt C., Westermark G. T., Westermark P., Pepys M. B., Rennie J. A., Gilbey S. G.
Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient.
Diabetologia 31: 158-161 (1988)
- [189] Auterhoff H., Knabe J., Höltje H.-D.
Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie.
Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1991)
- [190] Whittingham J. L., Scott D. J., Chance K., Wilson A., Finch J., Brange J., Dodson G. G.
Insulin at pH 2: Structural analysis of the conditions promoting Insulin fibre formation.
J. Mol. Biol. 318: 479-490 (2002)
- [191] Walz R., Knauf M.
Vorgaben und Durchführung von Stabilitätsprüfungen pharmazeutischer Wirkstoffe und Arzneimittel.
Pharm. Ind. 70: 1135-1139 (2008)
- [192] Matthews B. R.
Regulatory aspects of stability testing in Europe.
Drug Dev. Ind. Pharm. 25: 831-856 (1999)
- [193] Ioerger B. P., Smith J. S.
Multiresidue method for the extraction and detection of organophosphate pesticides and their primary and secondary metabolites from beef tissue using HPLC.
J. Agric. Food Chem. 41: 303-307 (1993)
- [194] Stepensky D., Chorny M., Dabour Z., Schumacher I.
Long-term stability study of L-adrenaline injections: Kinetics of sulfonation and racemization pathways of drug degradation.
J. Pharm. Sci. 93: 969-980 (2004)
- [195] Zöfel P.
Statistik in der Praxis.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1992)
- [196] Rosenberg A., Nakatsugawa T.
Separation of parathion metabolites by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. A 294: 436-441 (1984)

-
- [197] Sultatos L. G., Costa L. G., Murphy S. D.
Determination of organophosphorus insecticides, their oxygen analogs and metabolites by high pressure liquid chromatography.
Chromatographia 15: 669-671 (1982)
- [198] Kraineva J.
Strukturuntersuchungen an Proteinen und Protein-Lipid Systemen mittels Infrarot-Spektroskopie und Röntgenbeugung.
Dissertation, Universität Dortmund (2006)
- [199] Hoyer G. L., Nolan P. E., LeDoux J. H., Moore L. A.
Selective stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for recombinant human regular insulin.
J. Chromatogr., A 699: 383-388 (1995)
- [200] Taluja A., Bae Y. H.
Role of a novel excipient poly(ethyleneglycol)-b-poly(L-histidine) in retention of physical stability of insuline at aqueous/organic interface.
Mol. Pharmaceutics 4: 561-570 (2007)
- [201] Dirix C., Meersman F., Heremans K.
Pressure stability of insulin: A fourier transform infrared spectroscopy study.
High Pressure Res. 23: 63-66 (2003)
- [202] Jansen R., Grudzielanek S., Dzwolak W., Winter R.
High pressure promotes circularly shaped insulin amyloid.
J. Mol. Biol. 338: 203-206 (2004)
- [203] Ma S., Cao X., Mak M., Sadik A., Walkner C., Freedman T. B., Lednev I. K., Dukor R. K., Nafie L. A.
Vibrational circular dichroism shows unusual sensitivity to protein fibril formation and development in solution.
J. Am. Chem. Soc. 129: 12364-12365 (2007)
- [204] Beychok S.
Side-chain optical activity in cystine-containing proteins: Circular dichroism studies.
Biochemistry 53: 999-1006 (1965)
- [205] Melberg S. G., Johnson W. C.
Changes in secondary structure follow the dissociation of human insulin hexamers: A circular dichroism study.
Proteins: Struct., Function, Gen. 8: 280-286 (1990)
- [206] Voigt R.
Pharmazeutische Technologie
Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (2000)

GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Reagenz	Gefahrstoffsymbole	Sicherheitsratschläge
Acetonitril (LiChrosolv [®])	F; Xn	16-36/37
2-Aminoethanol 99% (V/V)	C; Xn	26-36/37/39-45
Distickstoffmonoxid	O	9-17
D-Penicillamin	Xi	-
Ethanol 70% (V/V)	F	7-16
Kohrsolin [®]	Xn	9-23-24-26-37/39-45
3-Methylphenol	T	36/37/39
Norepinephrin-L-bitartrat	T+	36/37/39-45
1-Octansulfonsäure-Natrium	Xi	-
Paraoxon	T+	36/37/39-45
Phenol, kristallin	T	24/25-34
Phosphorsäure 85% (V/V)	C	26-36/37/39
Physostigminsalicylat	T+	23-45
2-Propanol	F; Xi	7-16-24/25-26
Salzsäure 1M	C	26-45
Thioglycolat-Nährboden G	Xi	24-37
Triethylamin	C; F	3-16-26-29-36/37/39-45
Triton [®] X-100	Xi	36/37/39

BEZUGSQUELLENNACHWEIS

Acetonitril (LiChrosolv [®])	Merck, Darmstadt
Actrapid [®] 40 I.E./ml	Novo Nordisk, Bagsværd (Dänemark)
2-Aminoethanol 99% (V/V)	Acros, Geel (Belgien)
Anaerocult [®] A	Merck, Darmstadt
Anaerocult [®] C	Merck, Darmstadt
Bactolin [®] Basic Plus	Bode, Hamburg
CASO-Agar	Merck, Darmstadt
CASO-Bouillon	Merck, Darmstadt
Dinatriumdisulfid	Fluka, Buchs (Schweiz)
Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Distickstoffoxid (Ph.Eur.)	Westfalen, Münster
D-Penicillamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol 70% (V/V)	Carl Roth, Karlsruhe
Fleisch-Leber-Agar	Merck, Darmstadt
Glycerol 87% (V/V)	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid, purissimum	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat, pro analysi	Riedel-de Haën, Seelze
Kohlendioxid	Air Liquide, Leipzig
Kohrsolin [®]	Bode, Hamburg
LIVE/DEAD [®] BacLight™ L7012	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Malzextrakt-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
3-Methylphenol	Carl Roth, Karlsruhe
Nährkartonscheiben	Sartorius, Göttingen
Natriumchlorid, pro analysi	Merck, Darmstadt
Natrium-DL-lactat-Lösung 50% (m/V)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumsulfat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Norepinephrin-L-bitartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
1-Octansulfonsäure-Natrium	Fluka, Buchs (Schweiz)
Paraoxon	Fagron, Barsbüttel
Phenol, kristallin	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure 85% (V/V)	Carl Roth, Karlsruhe

Physostigminsalicylat	Fagron, Barsbüttel
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Pseudomonas-Agar P	Merck, Darmstadt
R2A-Agar	Merck, Darmstadt
Sabouraud-4%-Glucose-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure 1M	Carl Roth, Karlsruhe
Sauerstoff (Ph.Eur.)	Air Liquide, Leipzig
Sterillium [®]	Bode, Hamburg
Stickstoff 5.0	Westfalen, Münster
Siliciumcarbid; SiC-P600'06	Sympatec, Clausthal-Zellerfeld
Thioglycolat-Nährboden G	Merck, Darmstadt
Triethylamin	Fluka, Buchs (Schweiz)
Triton [®] X-100	Amresco, Solo (USA)
Zink-Insulin, human	Elly Lilly, Greenfield (USA)

LEBENS LAUF

Name Enrico Hanusa
Geboren am 08. 02. 1979 in Altdöbern

Schul Ausbildung

1985-1992 Georg-Schuhmann-Oberschule Mockrehna
1992-1994 Karl-August-Möbius-Gymnasium Eilenburg
1994-1997 Johann-Walter-Gymnasium Torgau

Wehrdienst

Nov. 1997-Aug. 1998 1. Sanitätsregiment 7 Hamm

Studium

Okt. 1998-Nov. 2002 Studium der Pharmazie an der Universität Leipzig
22. 03. 2001 1. Staatsexamen
05. 12. 2002 2. Staatsexamen

Praktisches Jahr

Jan. 2003-Jun. 2003 Universität Leipzig, Institut für Pharmazie-Pharmazeutische
Technologie
Aug. 2003-Jan. 2004 Apotheke Panitzsch
14. 04. 2004 3. Staatsexamen
Apr. 2004 Approbation als Apotheker

Diplom

Jan. 2003-Jun. 2003 Diplom der Pharmazie am Institut für Pharmazie der
Universität Leipzig unter Anleitung von Prof. Dr.
C. S. Leopold. Thema: Entwicklung einer nicht-invasiven
Meßmethode zur pharmakodynamischen Erfassung der
kutanen Penetration von Lokalanästhetika basierend auf dem
Pin Prick Test

Berufstätigkeit

01. 04. 2004	Beginn der Dissertation unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C. S. Leopold
Apr. 2004-Sept. 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie, Universität Leipzig
Okt. 2005-Mär. 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Technologie, Universität Hamburg
seit Apr. 2008	Mitarbeiter der Bayer Bitterfeld GmbH

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Diplom der Pharmazie

Aug. 2003	Entwicklung einer nicht-invasiven Meßmethode zur pharmakodynamischen Erfassung der kutanen Penetration von Lokalanästhetika basierend auf dem Pin Prick Test
-----------	--

Vorträge

Nov. 2004	Mitteldeutsche Technologentagung, Halle: „Entkeimung durch Druckwechsel“
Feb. 2005	DPhG-Doktorandentagung, Leipzig: „Entkeimung mittels Druckwechselverfahren“
Dez. 2005	Fachsymposium „Sterilisation pharmazeutischer Wirkstoffe unter der Lupe,, Barleben: „Möglichkeiten und Grenzen verschiedener Sterilisationsverfahren aus pharmazeutisch-technologischer Sicht“

Posterpräsentationen

Sept. 2005	DPhG Jahrestagung, Mainz: „Die Druckwechseltechnologie als neues Entkeimungsverfahren“
Mär. 2006	5 th World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf: „Pressure Change Technology as Novel Sterilisation Method?“

-
- Jul. 2007 34th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Long Beach: „An optimized Pin Prick Test for the pharmacodynamic quantification of the cutaneous penetration of local anaesthetics: A pilot study”
- Apr. 2008 6th World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona: „Pressure Change Technology as a gentle Cold Sterilisation Procedure for Thermosensitive Drug Solutions”
- Jul. 2008 35th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, New York: „Stability of Aqueous Human Insulin Solutions after Pressure Change Treatment“