Aus dem Institut für Phytomedizin der Universität Hohenheim
Fachgebiet Phytopathologie
Prof. Dr. Ralf Thomas Vögele

Plasma als Nacherntebehandlung gegen *Monilinia spp.* auf Zwetschge

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften
Dr. sc. agr.

vorgelegt

der Fakultät für Agrarwissenschaften

von

Julia Fütterer
geb. Wimmer
aus Villingen-Schwenningen

im Dezember 2015

Die vorliegende Arbeit wurde am 15. März 2016 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 04.April 2016

Leiter der Prüfung: Prof. Dr. Stefan Böttinger
Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. Ralf Thomas Vögele
Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. Jens Norbert Wünsche
Weiterer Berichter, 3. Prüfer: Prof. Dr. Dominikus Kittemann

Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 8 Absatz 2 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr.sc.agr.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema
   Plasma als Nacherntebehandlung gegen *Monilinia spp.* auf Zwetschge
   handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ravensburg, den 11.04.2016 Julia Fritterer

Ort und Datum Unterschrift

Eidesstattliche Versicherung -Belehrung

Die Universität Hohenheim verlangt eine Eidesstattliche Versicherung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen, um sich glaubhaft zu versichern, dass die Promovendin bzw. der Promovend die wissenschaftlichen Leistungen eigenständig erbracht hat.

Weil der Gesetzgeber der Eidesstattlichen Versicherung eine besondere Bedeutung beimisst und sie erhebliche Folgen haben kann, hat der Gesetzgeber die Abgabe einer falschen eidesstattlichen Versicherung unter Strafe gestellt. Bei vorsätzlicher (also wissentlicher) Abgabe einer falschen Erklärung droht eine Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder eine Geldstrafe.

Eine fahrlässige Abgabe (also Abgabe, obwohl Sie hätten erkennen müssen, dass die Erklärung nicht den Tatsachen entspricht) kann eine Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder eine Geldstrafe nach sich ziehen.

Die entsprechenden Strafvorschriften sind in § 156 StGB (falsche Versicherung an Eides Statt) und in § 161 StGB (Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt) wiedergegeben.

§ 156 StGB: Falsche Versicherung an Eides Statt:

Wer vor einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

§ 161 StGB: Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt:

Abs. 1: Wenn eine der in den §§ 154 und 156 bezeichneten Handlungen aus Fahrlässigkeit begangen worden ist, so tritt Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe ein.

Abs. 2: Straflosigkeit tritt ein, wenn der Täter die falsche Angabe rechtzeitig berichtigt. Die Vorschriften des § 158 Absätze 2 und 3 gelten entsprechend.

Ich habe die Belehrung zur Eidesstattlichen Versicherung zur Kenntnis genommen.

Ravensburg, den 11.04.2016 Julia Futterer

Ort und Datum Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **VII**

Tabellenverzeichnis ..... **IX**

Abkürzungsverzeichnis ..... **XI**

Zusammenfassung ..... **XII**

Abstract ..... **XIV**

Vorwort ..... **XV**

1. Einleitung **1**

1.1 Die Europäische Pflaume *Prunus domestica* (L.) 1

1.2 Fruchtqualitätsparameter 2

1.3 Der Fruchtfäuleerreger *Monilinia spp.* 5

1.4 *Monilinia spp.* im Zwetschgenanbau 8

1.5 Die Plasmatechnik 11

1.6 Antimikrobielle Wirkmechanismen einer Plasmabehandlung 13

1.7 Plasma als Nacherntebehandlung gegen *Monilinia spp.* auf Zwetschge 15

1.8 Hypothesen und Fragestellungen dieser Arbeit 16

2. Material und Methoden **18**

2.1 Computerprogramme 18

2.2 Material 18

2.3 Gerätschaften 19

2.4 Chemikalien und Medienzusätze 20

2.5 Kultivierung von *Monilinia spp.* im Labor 21

2.6 Zwetschgensorten und Modellsubstrate 22

2.7 Herstellung von Inokulum und Inokulation der Modellsubstrate 23

2.8 Inokulation von Zwetschgen 24

2.9 Plasmabehandlungen 24

2.10 Bestimmung der Fruchtqualität nach der Plasmabehandlung 27

2.10.1 Bestimmung des Vitamin C-Gehalts 28

2.10.2 Bestimmung des Polyphenolgehalts 29

2.11 Charakterisierung des Plasmas 31

2.12 Auswertung der Daten und Statistik 31

2.12.1 Univariate Varianzanalyse 32

2.12.2 T-Test 32

3. Ergebnisse **33**

3.1 Kontrollbeobachtungen und Vorversuche 33

3.1.1 Temperaturüberwachung 33

3.1.2 Wärmeeffekt 34
3.1.3 Behandlung von Sporen auf PET-Folie 35
3.1.4 Vorversuch zur Plasmabehandlung von Myzel 36
3.1.5 Vorversuche zur Plasmabehandlung von Konidien 37
3.1.6 Künstliche Inokulation von Zwetschgen 38
3.2 Plasmabehandlung von Myzel 41
3.3 Plasmabehandlung von Konidien 42
3.4 Plasmabehandlung künstlich inokulierter Zwetschgen 43
3.5 Fruchtqualitätsanalyse plasmabehandelter Zwetschgen 46
3.5.1 Farbe der Fruchthaut 47
3.5.2 Fruchtfleischfestigkeit 48
3.5.3 Säuregehalt 50
3.5.4 Zuckergehalt 51
3.5.5 Vitamin C-Gehalt 53
3.5.6 Polyphenolgehalt 54
3.6 Untersuchungen zu den Wirkmechanismen des Plasmas 57
3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse 58
4. Diskussion 60
4.1 Wirkmechanismen im Plasma 61
4.2 Möglicher Wärmeeffekt durch die Plasmabehandlung 63
4.3 Plasmabehandlung von Myzel 64
4.4 Plasmabehandlung von Sporen 67
4.5 Inokulation und Plasmabehandlung von Zwetschgen 68
4.6 Mögliche Auswirkungen der Plasmabehandlung auf die Fruchtqualität 70
4.7 Praktische Anwendung einer Plasmabehandlung 72
4.8 Schlussfolgerung 74
5. Literaturverzeichnis 76
6. Anhang 87
6.1 Rezepturen der Medien 87
6.1.1 Kartoffel-Dextrose-Agar 87
6.1.2 Kartoffel-Dextrose-Bouillon 87
6.1.3 Aprikosenagar 87
6.1.4 Ringerlösung 87
6.1.5 Einfriermedium für Konidien 87
6.1.6 Einfriermedium für Myzel 87
6.1.7 Zuckerlösung zur Vorinkubation der Sporen 87
6.2 Detaillierte Statistik 88
6.2.1 Wärmeeffekt 88

6.2.2 Plasmabehandlung von Myzel 88
6.2.3 Plasmabehandlung von Sporen 89
6.2.4 Plasmabehandlung künstlich inokulierter Zwetschgen 89
6.2.5 Fruchtqualität 90
6.2.6 Plasmacharakterisierung 99
6.3 Künstliche Inokulation und Plasmabehandlung von Zwetschgen 99
Danksagung 101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Molekulare Grundstrukturen häufiger phenolischer Verbindungen. 4
Abbildung 2. Grafische Darstellung des Lebenszyklus von *Monilinia spp.* 6
Abbildung 3. Symptome von *Monilinia spp.* an Zwetschgen. 7
Abbildung 4. Mit Sandpapier verletzte Zwetschgenoberfläche. 24
Abbildung 5. Schematische Darstellung des Mikrowellen-Plasmabrenners. 25
Abbildung 6. Vorrichtungen zur Plasmabehandlung. 26
Abbildung 7. Grafische Darstellung des Lab-Farbraumes. 28
Abbildung 8. Transmissionsspektrum von MgF_2. 31
Abbildung 9. Messung der Oberflächentemperatur verwendeter Modellsubstrate. 33
Abbildung 10. Überprüfung eines möglichen Wärmeeffektes auf *M. laxa*. 34
Abbildung 11. Applikationstechnik und Resultat einer Sporensuspension auf PET-Folie. ..35
Abbildung 12. Vorversuch zur Plasmabehandlung von Myzelsuspension auf PDA. 36
Abbildung 13. Plasmabehandlung von Konidien, Vorversuch. 37
Abbildung 14: Inokulation intakter Früchte mit Myzelsuspension. 38
Abbildung 15. Inokulation intakter Früchte mit Sporensuspension. 39
Abbildung 16. Vergrößerter Ausschnitt mit Sporensuspension inokulierter Früchte. 39
Abbildung 17. Vergleich von Myzelsuspension und Sporensuspension. 40
Abbildung 18. Vergleich zweier Sporensuspensionen. 40
Abbildung 19. Plasmabehandlung von Myzel, Zeitreihe, Darstellung im Boxplot. 41
Abbildung 20. Plasmabehandlung von Myzel, Zeitreihe. Lineare Darstellung 41
Abbildung 21. Plasmabehandlung von Konidien, Zeitreihe, Darstellung im Boxplot. 43
Abbildung 22. Wirkung einer Plasmabehandlung in verschiedenen Abständen zur Plasmaflamme. 44
Abbildung 23. Temperaturverlauf großer und kleiner Früchte im Vergleich. 44
Abbildung 24. Temperaturverlauf der Zwetschgenoberfläche. 44
Abbildung 25. Mittlerer Läsionsdurchmesser von *M. laxa* auf Zwetschgen. 45
Abbildung 26. Farbe der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka. 47
Abbildung 27. Farbe der Fruchthaut der Varianten aus dem Kontrollversuch. 48
Abbildung 28. Fruchtfleischfestigkeit der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka. 49
Abbildung 29. Fruchtfleischfestigkeit der Varianten aus dem Kontrollversuch. 49
Abbildung 30. Säuregehalt der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka. 50
Abbildung 31. Säuregehalt der Varianten aus dem Kontrollversuch. 51
Abbildung 32. Zuckergehalt der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka. 52
Abbildung 33. Zuckergehalt der Varianten aus dem Kontrollversuch. 52
Abbildung 34. Vitamin C-Konzentration der Sorten Hanita und Hauszwetschge. 53
Abbildung 35. Gehalt an Hydroxyzimtsäuren 1-10. 54

Abbildung 36. Gehalt an Hydroxyzimtsäuren, Flavonen und Flavonolen 1-6. 55
Abbildung 37. Gehalt unbekannter phenolischer Verbindungen Nr. 1, 2, 3. 56
Abbildung 38. Gehalt an Anthocyanen 1 - 3.....56
Abbildung 39. Effekt der Wirkmechanismen des Plasmas auf Myzel von *M. laxa*. 57
Abbildung 40. Schematische Darstellung einer Abtötungskinetik. 65
Abbildung 41. 5-minütige Plasmabehandlung von *M. laxa* auf Zwetschge. 99
Abbildung 42. 10-minütige Plasmabehandlung von *M. laxa* auf Zwetschge. 100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Antioxidative Kapazität verschiedener Obstarten. 4
Tabelle 2. Detaillierte Auflistung der verwendeten Computerprogramme. 18
Tabelle 3. Detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien und Gerätschaften. 18
Tabelle 4. Auflistung der eingesetzten Gerätschaften. 19
Tabelle 5. Auflistung der für die durchgeführten Versuche verwendeten Chemikalien. 20
Tabelle 6. Mittlere Abtötungsrate von Myzel. 42
Tabelle 7. Auflistung der im Text beschriebenen Varianten für die Kontrollversuche. 46
Tabelle 8. Wärmeeffekt auf den Myzeldurchmesser einer *M. laxa* Kultur. 88
Tabelle 9. Wärmeeffekt auf die KbE aus einer Myzelsuspension von *M. laxa*. 88
Tabelle 10. Vorversuch Plasmabehandlung von Myzel. 88
Tabelle 11. Plasmabehandlung von Myzel, Zeitreihe. 89
Tabelle 12. Plasmabehandlung von Sporen, 5 Minuten Behandlungsdauer. 89
Tabelle 13. Plasmabehandlung von Sporen, Zeitreihe. 89
Tabelle 14. Mittlerer Läsionsdurchmesser in cm künstlich inokulierter Früchte. 89
Tabelle 15. Mittlere Farbwerte plasmabehandelter Früchte der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka. 90
Tabelle 16. Mittlere Farbwerte plasmabehandelter Früchte aus dem Kontrollversuch verschiedener Varianten (1-9). 90
Tabelle 17. Mittlere Festigkeit plasmabehandelter Früchte der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka. 91
Tabelle 18. Mittlere Festigkeit plasmabehandelter Früchte aus dem Kontrollversuch verschiedener Varianten (1-9). 91
Tabelle 19. Mittlerer Säuregehalt plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita, Hauszwetschge und Katinka. 92
Tabelle 20. Mittlerer Säuregehalt plasmabehandelter Früchte aus dem Kontrollversuch verschiedener Varianten (1-9). 93
Tabelle 21. Mittlerer Zuckergehalt plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita, Hauszwetschge und Katinka. 93
Tabelle 22. Mittlerer Zuckergehalt plasmabehandelter Früchte aus dem Kontrollversuch verschiedener Varianten (1-9). 94
Tabelle 23. Mittlerer Gehalt an Vitamin C plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita und Hauszwetschge. 94
Tabelle 24. Mittlerer Gehalt an Hydroxyzimtsäuren (HCA, Nr. 1-5) plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita. 95
Tabelle 25. Mittlerer Gehalt an Hydroxyzimtsäuren (HCA, Nr. 6-9) plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita. 96

Tabelle 26. Mittlerer Gehalt an spezifischen Hydroxyzimtsäuren, Flavonen und Flavonolen plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita. 97
Tabelle 27. Mittlerer Gehalt unbekannter phenolischer Verbindungen in plasmabehandelten Früchten der Sorte Hanita. 98
Tabelle 28. Mittlerer Anthocyan-Gehalt plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita. 98
Tabelle 29. Charakterisierung der Wirkmechanismen einer Plasmabehandlung 99

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aprikosen Agar
ANOVA	Analysis of Variance / (univariate) Varianzanalyse
APS	Atmospheric Microwave Plasma Source / Mikrowellenplasmabrenner bei Atmosphärendruck
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Ausl.	Auslagerung
BBCH	Code zur Bewertung der morphologischen Entwicklung bei Pflanzen
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
EHEC	Enterohämorrhagische *Escherichia coli*
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization / Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
GD	Grenzdifferenz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Hochleistungsflüssigchromatographie
HSD	Honestly significant difference / Tukey-HSD
IGVP	Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie
KbE	Kolonie bildende Einheiten
KOB	Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee
LSD	Least significant difference
LTZ	Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg
Milli Q	Reinstwasser
mval	Milliäquivalent (Äquivalentgewicht)
MW	Mittelwert
OD_{600}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PDA	Potato Dextrose Agar / Kartoffel Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth / Kartoffel Dextrose Bouillon
PET	Polyethylenterephthalat
P_{MW}	Leistung der Mikrowelle
rcf	Relative centrifugal force
RF	Retentionsfaktor
rpm	Rotations per minute / Umdrehungen pro Minute
SKLM	Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln
slm	Standardliter / Min. (Volumen / Zeiteinheit unter Normbedingungen)
spp.	*species pluralis*
Stdabw.	Standardabweichung
TS	Trockensubstanz
UoH	University of Hohenheim / Universität Hohenheim
UV	Ultraviolette Strahlung
VUV	Vakuum UV
1-MCP	1-Methylcyclopropen
Φ (phi)	Dimensionslose Kennzahl für den Durchsatz von Strömungsmaschinen

Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

Die Ergebnisse zeigen, dass die beschriebene Methode eine sehr präzise Entwicklung und Abstimmung auf den Erreger und das Substrat erfordert. So kann beispielsweise die Wirkung

des Plasmas auf Sporen durch die Anpassung der Parameter unter Umständen verbessert werden. Die gute Wirkung gegen Myzel von *Monilinia laxa* sowie die Schonung der Fruchtqualität plasmabehandelter Zwetschgen hat jedoch auch die grundsätzliche Praxistauglichkeit der Methode bewiesen.

Abstract

In the scope of this project, the principle suitability of plasma as a postharvest treatment against *Monilinia spp.* on plum was surveyed. The plasma was generated using a microwave driven plasma torch at atmospheric pressure using air as process gas. Representing the three main *Monilinia* species in pomiculture (*M. laxa, M. fructigena and M. fructicola*), *M. laxa* was used as model organism for all experiments. Both spores and mycelium were attempted to be inactivated by plasma treatment. For a simplified experimental procedure, agar plates were used as model substrates. To show a possible practical implementation of the technique, plums were also plasma treated with the aim of showing the efficacy on the fruit and possible effects on several fruit quality parameters.

After plasma treatment duration of 5 minutes, a significant reduction of *M. laxa* mycelium could already be shown. After 10 minutes of plasma treatment, a reduction of more than 90 % could be achieved. Thereby a characteristic three-phase course of the inactivation slope was observed. In contrast to these results, spores of *M. laxa* were proven to be more resistant. Even after 10 minutes of plasma application, no significant reduction of spore germination could be achieved. During the plasma treatments a heating of the substrates could not be avoided. The agar plates used as model substrates thereby showed a good thermal capacity. In contrast, plums had to be cooled in advance to avoid the melting of the wax layer of the fruit cuticle.

For the artificial inoculation of plums the fruit cuticle was wounded to enable the pathogen to penetrate into the fruit flesh. As the inoculum cannot be reached by the superficial acting components of the plasma inside the fruit, the plasma treatment was not effective against fruit infections.

To investigate a possible effect of the plasma treatment on fruit quality, skin colour, fruit flesh density as well as the content of sugar, acids, ascorbic acid and polyphenols were analysed. The results did not show any significant effects in comparison to untreated control fruit.

By shielding mycelium on agar plates from plasma radicals using MgF_2 platelets as filters during the treatment, it could be shown that the plasma effects are based on synergy of UV-radiation and radicals.

The results show that the described method needs a very precise development and adjustment on the pathogen and the substrate. For example, the plasma effect on spores could be improved by appropriate modification of the plasma parameters. However, the effects on mycelia of *M. laxa* and the protection of the fruit quality parameters have shown a general practicability.

Vorwort

Diese Dissertation ist in Zusammenarbeit des Instituts für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) an der Universität Stuttgart, des Fachgebietes Phytomedizin der Universität Hohenheim (UoH) sowie des Kompetenzzentrums für Obstbau Bodensee (KOB) in Ravensburg entstanden. Am IGVP arbeiten Dr. Matthias Walker, Dr. Andreas Schulz und Dr. Martina Leins bereits seit einigen Jahren an der Dekontamination von Gewürzen mit Plasma. Von ihnen stammt die Idee, eine Plasmabehandlung auch gegen Phytopathogene auf frischem Obst und Gemüse anzuwenden. Auf diese Weise entstand der Kontakt mit dem KOB.

In zahlreichen Publikationen der letzten Jahre wurde die Abtötung humanpathogener Keime auf frischen Lebensmitteln mit Plasma beschrieben. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen primär auf der Gewährleistung sicherer Lebensmittel für den Konsumenten. Ob Plasma auch zur Verbesserung der Haltbarkeit frischer Früchte eingesetzt werden kann, wurde bisher noch nicht untersucht. Da es im Pflanzenbau und speziell im Obstbau einige problematische Erreger gibt, fiel die Entscheidung, sich auf einen phytopathogenen Erreger als Modellorganismus festzulegen. Grundsätzlich kann die hier angewandte Technik aber auch für die Abtötung einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen eingesetzt werden. Neben den häufig untersuchten Humanpathogenen zählen dazu auch eine große Zahl weiterer Pflanzenpathogene sowie Toxin produzierende Pilze.

Der für dieses Projekt eingesetzte Mikrowellenplasmabrenner erzeugt das Plasma bei Atmosphärendruck, wodurch im Gegensatz zu Plasmabehandlungen im Vakuum die Behandlung frischer Lebensmittel ermöglicht wird.

Die Plasmabehandlungen wurden vor Ort am IGVP mit dem dort entwickelten Mikrowellen Plasmabrenner durchgeführt. Prof. Dr. Vögele, der Leiter des Fachgebiets Phytopathologie an der Universität Hohenheim, hat die akademische Betreuung der Arbeit und die wissenschaftliche Unterstützung im Bereich der Pflanzenpathogene übernommen. Die Laboreinrichtung und das Versuchsmaterial sowie die Lagerräume für Zwetschgen wurden durch das KOB zur Verfügung gestellt.

1. Einleitung

Durch den Einsatz von wirksamen Fungiziden kann das Auftreten von *Monilinia spp.* auf Zwetschgen und anderen Steinobstsorten erfolgreich kontrolliert werden (Karaca *et al.*, 2014). Durch das vermehrte Auftreten resistenter Stämme unter den Phytopathogenen sowie Bedenken gegenüber Rückständen auf dem Produkt und in der Umwelt wird der Einsatz synthetischer Fungizide jedoch vermehrt eingeschränkt und in einigen Ländern bereits ganz verboten. Im deutschen Obstbau gibt es außer 1-MCP (1-Methylcyclopropen) beim Apfel keine zugelassenen Nacherntebehandlungen (Kittemann *et al.*, 2008). Auch in weiteren europäischen Ländern sind Nacherntebehandlungen nicht erlaubt (Mari *et al.*, 2004). Aus den genannten Gründen besteht deshalb ein international wachsendes Interesse an Nacherntebehandlungsmethoden, welche von den entsprechenden Behörden als unbedenklich eingestuft werden können. Bisher in diesem Bereich untersuchte Nacherntebehandlungen gegen *Monilinia spp.* beinhalteten unter anderem den Einsatz antagonistisch wirkender Organismen wie beispielsweise *Bacillus subtilis* in Kombination mit Heißwasserbehandlungen und diversen Lebensmittelzusatzstoffen (Droby *et al.*, 2003; Mari *et al.*, 2007; Gregori *et al.*, 2008; Casals *et al.*, 2010; Karaca *et al.*, 2014), die Begasung der Fruchtoberfläche mit Thymol (Liu *et al.*, 2002) oder den Einsatz von Ozon (Khadre *et al.*, 2001). All diese Methoden bedeuten jedoch den Eintrag von Wärme, Mikroorganismen oder chemischen Substanzen auf die Fruchtoberfläche, wodurch die Qualität der Frucht oder ihre Sicherheit beeinträchtigt werden kann. Zudem ist häufig eine Kombination der verschiedenen Methoden notwendig, um eine ausreichende Wirksamkeit zu erreichen (Mari *et al.*, 2007; Casals *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu stellt Plasma als physikalische Methode eine rückstandsfreie Behandlungsmöglichkeit dar, welche beim indirekten Einsatz oder der Verwendung kalter Plasmaquellen auch eine Erwärmung der Fruchtoberfläche vermeidet (SKLM, 2012). Zudem kann durch die Kombination verschiedener Wirkmechanismen im Plasma und ihre Synergie (Weltmann *et al.*, 2012) ein hoher Wirkungsgrad erwartet werden.
Um einen umfangreichen Überblick über die Problematik zu geben, werden in den folgenden Kapiteln der Zwetschgenanbau, der Erreger *Monilinia spp.* und seine Bedeutung sowie die Plasmatechnik ausführlich beschrieben.

1.1 Die Europäische Pflaume *Prunus domestica* (L.)

Pflaumen und Zwetschgen der Gattung *Prunus* gehören zur Familie der *Rosaceae* und werden in die zwei Arten *P. salinica* L. (Japanische Pflaume) und *P. domestica* L. (Europäische Pflaume) unterteilt (Manganaris *et al.*, 2008). Innerhalb der Art *P. domestica* wird zwischen Pflaumen, Zwetschgen, Renekloden und Mirabellen unterschieden (Winter und Link, 2002). Da sich diese Unterarten alle miteinander kreuzen lassen, ist die systematische Einordnung schwierig. Vor allem bei Pflaumen und Zwetschgen gibt es

gleitende Übergänge (Winter und Link, 2002). Da für die im Folgenden beschriebenen Versuche ausschließlich Früchte der Europäischen Pflaume eingesetzt wurden, wird in dieser Arbeit, sofern nicht abweichend vermerkt, die im Süddeutschen gebräuchliche Bezeichnung „Zwetschge“ verwendet, die damit aber alle Sorten dieser Art einschließt.

Die Zwetschgenfrüchte sind in der Mehrzahl länglich oval und im reifen Zustand blauschwarz gefärbt, mit variierenden Anteilen an Rot und Violett. Ein charakteristisches Merkmal der Zwetschgen ist eine silbrige Wachsschicht (Beduftung) auf der Fruchthaut, welche die Früchte lila bis dunkelblau erscheinen lässt. Eine intakte Beduftung ist wichtiges Merkmal für Qualität und Frische der Frucht. Die Wachsschicht ist der Fruchtepidermis aufgelagert und besteht aus einer unteren, der Kutikula zugewandten, amorphen Wachsschicht, welcher kristalline über die Oberfläche hinausragende Wachskörnchen aufgelagert sind. Dabei bildet diese obere Wachsschicht die sichtbare Beduftung (Storey und Price, 1999).

Der Vermarktungserfolg von Zwetschgen wird hauptsächlich durch die Qualität der Früchte nach der Ernte bestimmt. Die Qualitätsmerkmale werden dabei von den Anforderungen des Verbrauchers definiert. Diese Merkmale beinhalten primär die Optik, die Textur des Fruchtfleisches, das Aroma, den Nährwert der Frucht und die Produktsicherheit (womit Hygiene und Rückstandsmanagement gemeint sind) (Crisosto *et al.*, 1995). Der Großteil dieser Qualitätsparameter wird bereits vor der Ernte festgelegt und ist zunächst von der Sorte und dem Standort der Kultur sowie weiterhin von der Anbaupraxis und den Bedingungen nach der Ernte abhängig. Für die Fruchtqualität von Zwetschgen ist das Reifestadium der Frucht zum Erntezeitpunkt der wichtigste qualitätsbestimmende Faktor (Crisosto *et al.*, 1995; Crisosto *et al.*, 2004). Für eine volle Ausprägung des Aromas und eine angenehme Fruchtfleischfestigkeit sollten die Früchte „genussreif“ geerntet werden. Allerdings nimmt die Lagerfähigkeit der Früchte mit zunehmender Reife ab. Gründe hierfür sind der Festigkeitsabbau, das Auftreten von Fäulen wie *Monilinia spp.* und von physiologischen Schäden wie beispielsweise Fleischbräune. Um die Anforderungen der Verbraucher zu erfüllen und den Vermarktungserfolg zu sichern, muss demnach ein geeignetes Gleichgewicht zwischen Erntezeitpunkt und Nacherntebedingungen gefunden werden.

1.2 Fruchtqualitätsparameter

Typische Fruchtqualitätsparameter sind die Fruchtgröße, die Farbe der Fruchthaut, der Gehalt an löslicher Trockensubstanz, welcher näherungsweise den Zuckergehalt der Frucht wiedergibt, der Gehalt an titrierbaren Säuren, die Fruchtfleischfestigkeit und gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe wie beispielsweise Antioxidantien. Die Fruchtgröße ist einer der limitierenden Faktoren im Obstgroßhandel und wird durch Voraussetzungen vor der Ernte wie Wasserverfügbarkeit und Fruchtbehang bestimmt. Die Farbe der Frucht wird vorwiegend durch Anthocyane in der Schale bestimmt und ist stark von der Sorte, aber auch

von der Lichtverfügbarkeit am Baum abhängig. Der größte Teil an löslicher Trockensubstanz in Zwetschgen sind Zucker. Diese sind primär Glukose, Fruktose und Saccharose. Der Zuckergehalt hat für die Reifebestimmung und die Akzeptanz durch den Verbraucher eine bedeutende Aussagekraft. Ebenso wichtig ist der Säuregehalt einer Frucht. In Zwetschgen ist hauptsächlich Äpfelsäure enthalten, deren Gehalt im Laufe des Reifeprozesses reduziert wird. Neben den beschriebenen Inhaltsstoffen sind Zwetschgen reich an Antioxidantien. Dabei sind die wichtigsten Stoffe mit antioxidativer Wirkung phenolische Verbindungen und Ascorbinsäure (Vitamin C). Der Vitamin C-Gehalt von Zwetschgen liegt mit 51-169 mg / kg Frischgewicht in der Schale und 20-90 mg / kg Frischgewicht im Fruchtfleisch höher als beispielsweise in Bananen, Äpfeln, Aprikosen und Brombeeren (Manganaris *et al.*, 2008). Die Fruchtfleischfestigkeit ist ein wichtiger Qualitätsparameter, welcher den Erntezeitpunkt und die Lagerfähigkeit der Früchte bestimmt. Zwetschgen mit einer weichen, schmelzenden Textur werden als verzehrfähig bezeichnet (Manganaris *et al.*, 2008). Während des Reifeprozesses nimmt die Fruchtgröße und damit das Fruchtgewicht zu, ebenso der Zuckergehalt. Gleichzeitig werden der Säuregehalt und die Fruchtfleischfestigkeit reduziert. Die Farbe der Fruchthaut wird durch einen erhöhten Gehalt an Anthocyanen dunkler. Dagegen verändert sich der Gehalt weiterer Phenole in der Zwetschge durch den Reifevorgang nicht (Usenik *et al.*, 2008).

Phenolische Verbindungen sind im Pflanzenreich ubiquitär und demnach in allen Pflanzenteilen aller Früchte- und Gemüsepflanzen zu finden, jedoch mit unterschiedlicher Verteilung innerhalb der verschiedenen Pflanzenorgane (Robards *et al.*, 1999). Sie stellen eine der größeren Gruppen von in Pflanzen synthetisierten Sekundärmetaboliten dar. Ihre molekulare Struktur und ihre Funktionen sind sehr vielfältig. In ihrer Grundeinheit bestehen sie aus einem aromatischen Ring, der mit Hydroxylgruppen substituiert ist. Synthetisiert werden sie im Shikimatweg und im Phenylpropanoid-Stoffwechsel von Pflanzen. Das Schlüsselenzym ihrer Biosynthese, die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), kann durch verschiedene Stress- und Umweltfaktoren induziert werden, wodurch diese sich direkt auf den Gehalt an phenolischen Verbindungen in Pflanzenprodukten auswirken können (Tomás-Barberán und Espin, 2001). Für den Abbau von Phenolen sind Oxidasen (Polyphenol Oxidasen, PPO) und Peroxidasen (POD) zuständig (Tomás-Barberán und Espin, 2001). Das Vorkommen von Phenolen in Früchten wird demnach primär durch genetische Faktoren und Umwelteinflüsse bestimmt. Durch oxidative Prozesse während der Lagerung oder Weiterverarbeitung der Früchte kann es jedoch ebenfalls beeinflusst werden (antioxidative Wirkung, Verbräunung der Früchte durch Oxidation der Phenole) (Robards *et al.*, 1999). Die größte Gruppe phenolischer Verbindungen sind die Flavonoide. Zu dieser Gruppe gehören die vorwiegend vorkommenden Flavanole (z.B. Proanthocyanidine), Flavonole (z.B. Quercetin) und Anthocyane. Neben den Flavonoiden sind

Hydroxyzimtsäuren, darunter vor allem die Chlorogensäure, häufig nachzuweisen (Robards *et al.*, 1999; Abbildung 1).

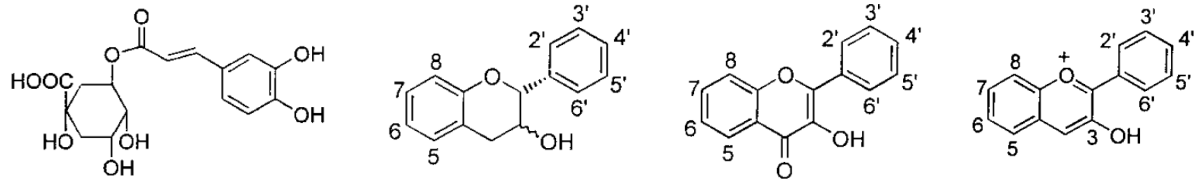

Abbildung 1. Molekulare Grundstrukturen häufiger phenolischer Verbindungen.

Grafik modifiziert nach Robards *et al.*, 1999.

Für die Qualität von pflanzlichen Lebensmitteln haben phenolische Verbindungen eine wichtige Bedeutung. Unter anderem beeinflussen sie deren Optik, Geschmack und gesundheitsfördernde Eigenschaften (Tomás-Barberán und Espin, 2001; Kim *et al.*, 2003a). Durch ihre gerinnungshemmenden, antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften werden ihnen vorbeugende Wirkungen gegen Erkrankungen der koronaren Herzkranzgefäße und Krebs zugeschrieben (Tomás-Barberán und Espin, 2001; Kim *et al.*, 2003a). Diese positiven Effekte werden durch das Abfangen von freien Radikalen bewirkt, indem Phenole als reduzierende Agenzien, Wasserstoffdonatoren und Quencher für Singlet-Sauerstoff wirken. Auf diese Weise werden Zellen vor oxidativen Schäden geschützt. Vor allem roten, Anthocyan-reichen Früchten wird eine besonders antioxidative Wirkung nachgesagt (Treutter *et al.*, 2012). Zwetschgen haben im Vergleich zu anderen Früchten einen relativ hohen Phenolgehalt und damit einhergehend eine hohe antioxidative Kapazität (Tabelle 1; Kayano *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003a).

Tabelle 1. Antioxidative Kapazität verschiedener Obstarten.

Dargestellt ist die Kapazität Sauerstoffradikale zu absorbieren in µMol Trolox-Äquivalenten / g Frucht im Frischgewicht, Trockengewicht und im Fruchtsaftkonzentrat. Trolox ist ein Vitamin E Derivat, welches hier als Referenzsubstanz bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Proben eingesetzt wurde. Daten aus Wang *et al.*, 1996.

Fruchtart	Frischgewicht	Trockengewicht	Fruchtsaftkonzentrat
Erdbeere	15	150	12
Zwetschge	9	80	8
Orange	7	50	7
Rote Traube	7	36	4
Kiwi	6	36	6
Pinke Grapefruit	5	48	5
Weiße Traube	5	26	3
Banane	2	9	2
Apfel	2	13	2
Tomate	2	38	2
Birne	1	10	1
Melone	1	13	1

Die meisten phenolischen Verbindungen sind bei Zwetschgen in der Fruchthaut enthalten. Dabei sind die vorwiegend vorkommenden Anthocyane (Cyanidin 3-rutinosid, Cyanidin 3-glukosid und Peonidin 3-rutinosid), Derivate der Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäure und Neochlorogensäure), Proanthocyanine aus der Gruppe der Flavanole und Quercentin aus der Gruppe der Flavonole (Jaiswal *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2003a; Tomás-Barberán *et al.*, 2001). Die Grundstrukturen der beschriebenen Molekülgruppen sind in Abbildung 1 dargestellt.

Durch einen fachgerechten und professionellen Anbau können die beschriebenen Fruchtqualitätsparameter sichergestellt werden (Crisosto *et al.*, 1997; Manganaris *et al.*, 2008). Die Zwetschge ist dann eine gesunde, schmackhafte und vielseitig einsetzbare Frucht. Geeignete Maßnahmen nach der Ernte sollten dann dafür eingesetzt werden, diese Fruchtqualität zu erhalten. In der Vergangenheit hat der Vermarktungserfolg der Zwetschge jedoch durch eine zu geringe Qualität sowie durch das Auftreten von Fäulen nach der Ernte abgenommen. Als der häufigste Erreger dieser Fäulnissymptome werden *Monilinia spp.* beschrieben (Fritsch, 2009a).

1.3 Der Fruchtfäuleerreger *Monilinia spp.*

Monilinia spp. gehören neben *Botrytis cinerea*, *Gloeosporium spp*. und *Penicillium spp*. zu den bedeutendsten Erregern von Fruchtfäulen. Um die Bezeichnung „Fruchtfäule“ zu präzisieren, sind damit in dieser Arbeit, sofern nicht abweichend beschrieben, ausschließlich Pilze der Gattung *Monilinia* gemeint. Die Beschreibung der Erreger konzentriert sich zudem auf die drei hauptsächlich vorkommenden und für den Obstbau bedeutendsten Arten *Monilinia laxa* (Aderh. und Ruhl.) Honey, *Monilinia fructigena* (Aderh. und Ruhl.) Honey und *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey (Van Leeuwen und Van Kesteren, 1998).

Pilze der Gattung *Monilinia* infizieren verschiedene oberirdische Pflanzenteile von kultivierten Obstbäumen sowie vielen anderen Pflanzen der Familie der *Rosaceae.* Im Obstbau sind die Erreger vor allem für Kern- und Steinobst bedeutsam (Siegfried und Viret, 2010). Die wichtigsten kommerziell angebauten Obstarten, die als Wirte für *M. laxa*, *M. fructigena* und *M. fructicola* dienen, sind die Zwetschge (*Prunus domestica* L.), der Apfel (*Malus domestica* Borkh.), die Birne (*Pyrus communis* L.), die Quitte (*Cydonia oblongata* Mill.), Pfirsich und Nektarine (*Prunus persica* (L.) Batsch), die Aprikose (*Prunus armeniaca* L.), die Süßkirsche (*Prunus avium* L.) und die Sauerkirsche (Prunus cerasus L.) sowie die Mandel (Prunus amygdalus Batsch) (Byrde und Willetts, 1977; Holb, 2008).

In Abbildung 2 ist der Reproduktionszyklus von *Monilinia spp.* schematisch dargestellt. Dieser verläuft bei den beschriebenen *Monilinia* Arten ähnlich mit der Ausnahme, dass das perfekte Stadium von *Monilinia fructicola* eine größere Bedeutung hat als das der beiden anderen Arten (Byrde und Willetts, 1977). Die Pilze überwintern als Myzel in Fruchtmumien oder infizierten Geweben am Baum wie beispielsweise Cankern (Byrde und Willetts, 1977).

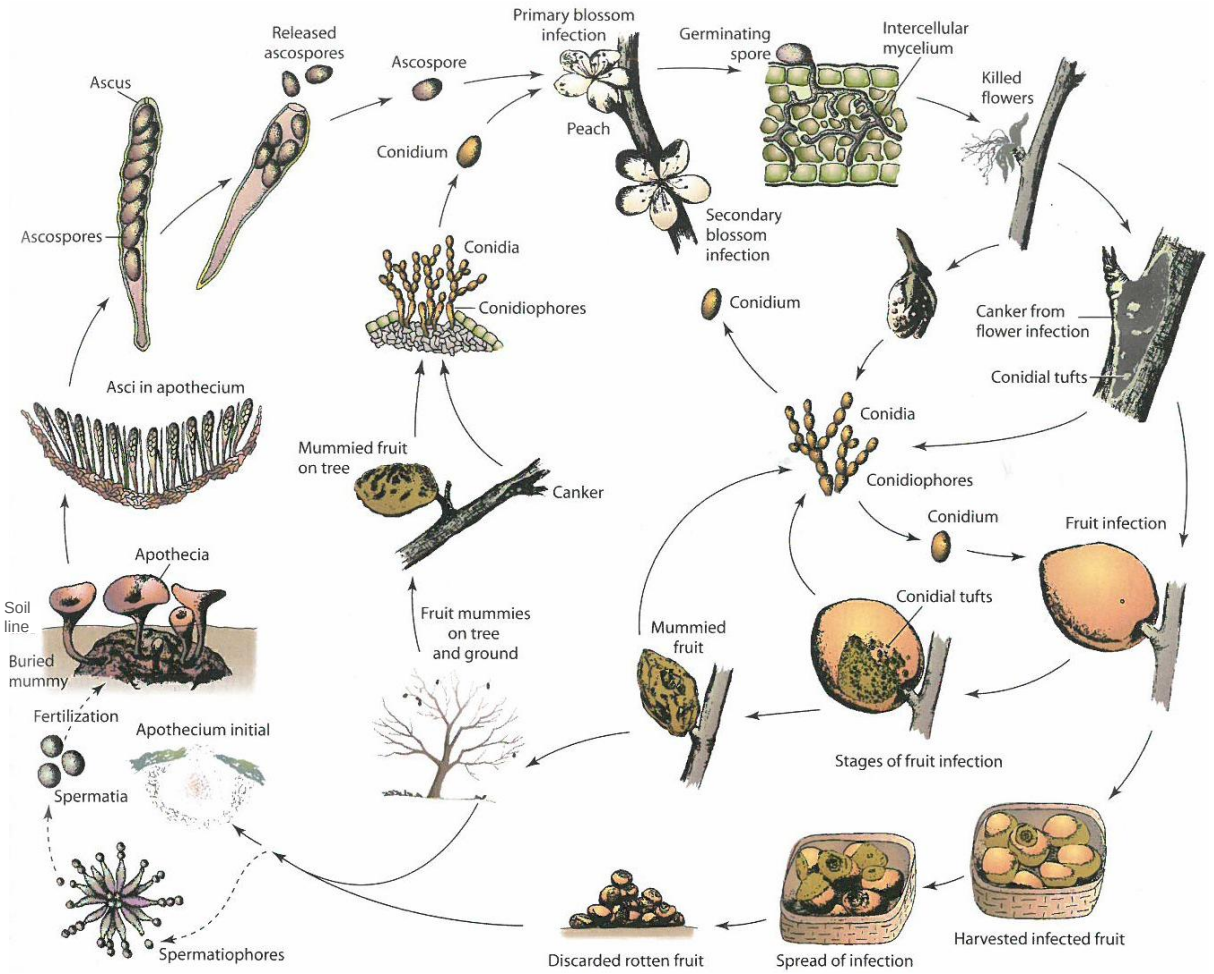

Abbildung 2. Grafische Darstellung des Lebenszyklus von *Monilinia spp.*

Es wird zwischen Primärinokulum, welches im Frühjahr zu den ersten Infektionen gesunder Blüten führt, und Sekundärinokulum aus primär infizierten Pflanzenteilen im Sommer unterschieden. Die sexuelle Reproduktion über Ascosporen wird in der Regel nur bei *Monilinia fructicola* beobachtet. Der Pilz überwintert in Cankern und Fruchtmumien. Grafik modifiziert nach Agrios, 2005.

Unter günstigen Bedingungen bilden sich im Frühjahr an diesen Stellen Konidiophoren, welche die asexuellen Sporen, die Konidien, enthalten. Sexuell gebildete Sporen, Ascosporen, werden nur von *Monilinia fructicola* gebildet (Byrde und Willetts, 1977; Michailides *et al.*, 2007). Diese entstehen in Apothecien, welche im Frühjahr auf am Boden liegenden Fruchtmumien gebildet werden. Als Ursache dafür wird vermutet, dass nur im Boden ausreichend Feuchtigkeit vorhanden ist um die Bildung der Apothecien anzuregen (Michailides *et al.*, 2007). Die beschriebenen Sporenformen, welche die ersten Infektionen auf jungen Pflanzenteilen im Frühjahr verursachen, werden zu diesem Zeitpunkt auch als Primärinokulum bezeichnet. Die wichtigsten Infektionsstellen hierfür sind die Blüten. Die Folge ist Blütenbrand, der sich dann auf Zweige und Blätter ausbreiten und zur sogenannten Spitzendürre führen kann (Byrde und Willetts, 1977). Bei Zwetschgen führen Blüteninfektionen nicht zwangsläufig zum Absterben des gesamten Blütenbüschels (Fritsch, 2009a). Für das Einwandern des Pilzmyzels in benachbarte Blüten sind längere Nässeperioden nötig. Kann der Pilz von der Blüte in den Ast eindringen, grenzt der Baum

das befallene Gewebe ab. Die Befallsstelle sinkt nekrotisch ein und es kommt zum typischen Gummifluss. Zudem kommt es zum Absterben der Rinde an dieser Stelle. Diese im Holz gebildeten Infektionsherde werden als Canker bezeichnet und dienen im Frühjahr des Folgejahres als Inokulumquelle für neue Infektionen (Byrde and Willetts, 1977). Von infizierten Blüten ausgehend, kann der Erreger auch auf junge Früchte übergehen. Generell sind jedoch grüne, unreife Früchte resistenter als reife Früchte (Byrde and Willetts, 1977; Villarino *et al.*, 2011). Die Infektion reifer Früchte geschieht in der Regel über Konidien, welche durch Wind, Wassertropfen oder Insekten übertragen werden oder auch über den direkten Kontakt mit bereits infizierten Pflanzenteilen wie Fruchtclustern. In diesem Fall kann auch das Myzel des Pilzes eine Infektion verursachen (Byrde und Willetts, 1977; Michailides und Morgan, 1997).

Erste Symptome auf der Frucht zeigen sich durch kleine und runde, braune Fäulnisstellen auf der Oberfläche, die sich allmählich weiter ausdehnen. Die fortschreitende Infektion führt zu einem typischen Erscheinungsbild: In konzentrischen Kreisen um die Infektionsstelle angeordnete Konidiophoren brechen durch die Oberfläche und bilden deutlich zu erkennende Sporenpolster (Sporodochien, siehe Abbildung 3).

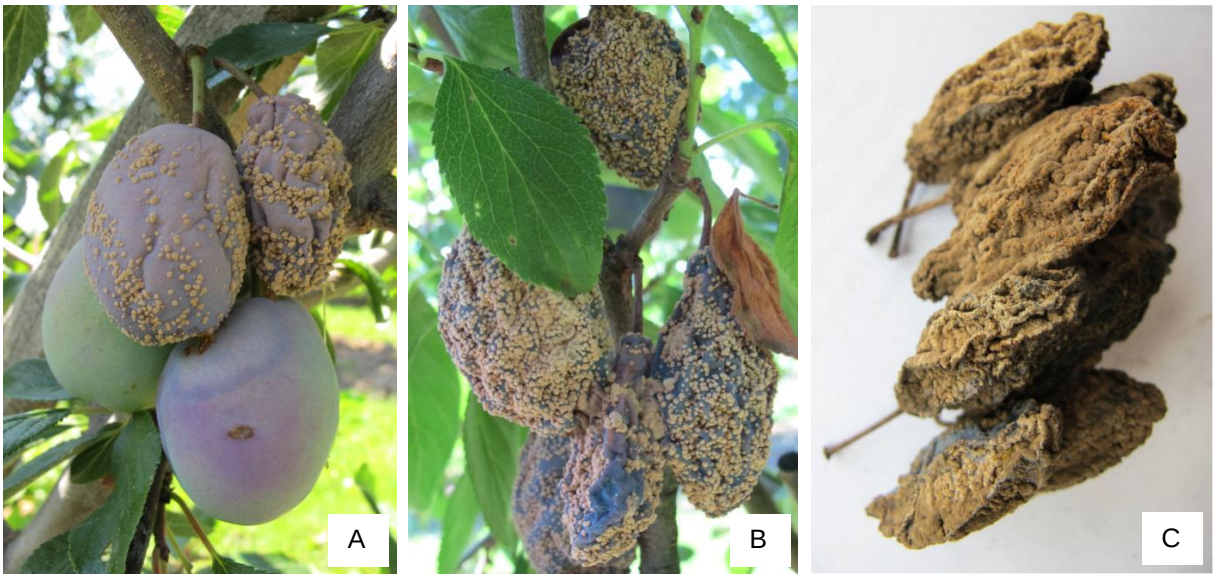

Abbildung 3. Symptome von *Monilinia spp.* an Zwetschgen.

A: Infektion einer Frucht durch Kontakt mit benachbarten, infizierten Früchten. Deutlich erkennbar sind die typischen Sporenpolster auf der Fruchtoberfläche. B: Zusammenhängender Klumpen aus infizierten Zwetschgen am Baum. C: Fruchtmumien im Frühjahr. Auf den vertrockneten Fruchtresten hat sich ein dichter Sporenrasen gebildet.

Diese dienen als neue Quelle für Inokulum und können so Sekundärinfektionen verursachen (Landgraf und Zehr, 1981; Biggs und Northover, 1985; Holb, 2008). In einem Cluster angeordnete Früchte werden durch benachbarte infizierte Früchte angesteckt (Abbildung 3A). Nach der Infektion einer Frucht breitet sich das Myzel aktiv darin aus und bildet ein dichtes Gewebe (Stroma), welches aus dicht verwobenen Hyphen besteht (Willetts und

Harada, 1984). Die Folge sind ausgetrocknete Früchte, deren Fruchtfleisch vollständig durch Stroma ersetzt wurde. Diese für *Monilinia spp*. charakteristischen Fruchtmumien verbleiben häufig in einem fest zusammengefügten Klumpen am Baum (Abbildung 3B). In den Fruchtmumien kann das Myzel lange Perioden ungünstiger Wetterbedingungen während des Winters überstehen und im Frühjahr erneut Sporen zur Vermehrung und Verbreitung des Pilzes produzieren (Abbildung 3C; Byrde und Willetts, 1977; Holb, 2008).

Bis zur Ausbildung sichtbarer Symptome kann der Pilz latent auf der Frucht vorliegen und erst bei optimalen Bedingungen (Temperatur, Verfügbarkeit von Wasser, Reifezustand der Frucht, Verletzungen der Fruchthaut) zur Fruchtfäule führen (Adaskaveg *et al.*, 2000). Obwohl also die Kolonisierung der Fruchtoberfläche durch den Pilz bereits am Baum stattgefunden hat, manifestiert sich die Infektion häufig erst nach der Ernte (Manganaris *et al.*, 2008). Deshalb können auch in allen Phasen nach der Ernte (Transport, Lagerung, Verkauf) noch bedeutende Verluste von reifen Früchten auftreten (Byrde und Willetts, 1977).

Verbreitet sind die beschriebenen *Monilinia*-Arten nahezu überall auf der Welt, wobei *M. laxa* und *M. fructigena* ursprünglich auf Länder der Alten Welt (Europa, Afrika, Asien) und *M. fructicola* auf Länder der neuen Welt (Amerika) sowie Australien und Neuseeland beschränkt waren (Byrde und Willetts, 1977; Van Leeuwen *et al.*, 2001). Durch den globalen Transport von landwirtschaftlichen Produkten haben sich die Arten jedoch auch in weiteren Ländern ausgebreitet. 2001 wurde *M. fructicola* zunächst in Frankreich und in den folgenden Jahren auch in weiteren europäischen Ländern nachgewiesen (EPPO, 2002; Petroczy und Palkovics, 2006; Duchoslavová *et al.*, 2007; Pellegrino *et al.*, 2009). Hinrichs-Berger und Müller (2010) konnten diese *Monilinia*-Art 2010 erstmals in Deutschland an Brombeeren nachweisen. Bereits 1988 wurde *M. fructicola* auf die Liste der Quarantäneorganismen für Europa gesetzt (EPPO, 1988) und im Jahr 2000 von der EU im Anhang I der Richtlinie 29 als nicht vorkommender, aber für die Europäische Gemeinschaft bedeutsamer Organismus, dessen Einführung verhindert werden sollte, aufgelistet (European Council, 2000).

1.4 *Monilinia spp.* im Zwetschgenanbau

In Kalifornien ist der Anbau und die Produktion von Dörrpflaumen eine wichtige Sparte des Obstbaus (Michailides *et al.*, 2007; Okie und Hancock, 2008). Hier werden 99 % der Dörrpflaumen für den Markt der Vereinigten Staaten, sowie 60-70 % des Weltmarktes angebaut und weiterverarbeitet. Die Fruchtfäule zählt in diesem Bereich zu den Erkrankungen, welche großen Schaden verursachen und jährlich zu erheblichen Verlusten führen (Michailides *et al.*, 2007). Dabei sind diese in der Nachernte größer als in der Vorernte und können auch in der Weiterverarbeitung noch auftreten (Michailides und Morgan, 1997; Boehm *et al.*, 2001). Unter für den Pilz günstigen Bedingungen können die Nachernteverluste 80-90 % erreichen (Hong *et al.*, 1997). *M. fructicola* wurde in Kalifornien vor allem auf infizierten Früchten nachgewiesen, *M. laxa* ist dagegen vorwiegend für die

Infektion von Blüten und Zweigen verantwortlich, kann aber ebenso Fruchtinfektionen verursachen (Michailides und Morgan, 1997; van Leeuwen *et al.*, 2001). Zudem wurde hier *M. laxa* vor allem auf Mandeln und Aprikosen nachgewiesen, während *M. fructicola* der vorherrschende Erreger von Fruchtfäule bei Pfirsichen, Nektarinen und Zwetschgen ist (Michailides *et al.*, 2007).

Auch in Europa spielt der Anbau von *Prunus domestica* Sorten seit alters her eine beachtliche Rolle (Winter und Link, 2002). Neben den Nachfolgestaaten des ehemaligen Jugoslawien und Rumänien ist Deutschland eines der wichtigsten Anbauländer (Neumueller, 2011). Ein konkurrenzfähiger Anbau entwickelt sich auch in Polen und Ungarn (Winter und Link, 2002). Ursprünglich waren in Europa die Arten *M. laxa* und *M. fructigena* vorherrschend (EPPO, 2009). Dabei war *M. fructigena* für die Infektion von Früchten bedeutender als als Ursache für Blütenbrand und Spitzendürre (Siegfried und Viret, 2010). Zudem wird diese Art sowohl mit Kernobst als auch mit Steinobst assoziiert (Siegfried und Viret, 2010). Dagegen wird *M. laxa* mit Infektionen an Blüten und Früchten gleichermaßen assoziiert und wird dabei vor allem für Fruchtfäule bei Steinobst verantwortlich gemacht (Holb, 2008). Seit der Einschleppung von *M. fructicola* nach Europa hat sich die Bedeutung der Arten in einigen Ländern jedoch verschoben (Villarino *et al.*, 2012; Papavasileiou *et al.*, 2015). In Griechenland wurden beispielsweise ausschließlich *M. laxa* und *M. fructicola* mit Fruchtfäulen an Pfirsich, Aprikose, Süßkirsche und Zwetschgen in Verbindung gebracht, *M. fructigena* konnte nicht nachgewiesen werden (Papavasileiou *et al.*, 2015). Außerdem wurde auf Pfirsich und Zwetschge ausschließlich die Art *M. fructicola* nachgewiesen. Auch in Spanien wurden in Pfirsich-Anlagen *M. laxa* und *M. fructicola*, jedoch nicht *M. fructigena* nachgewiesen (Villarino *et al.*, 2012). Ebenso wie in Kalifornien, sind die Verluste durch *Monilinia spp.* im europäischen Mittelmeerraum nach der Ernte größer als durch Symptombildung am Baum (Casals *et al.*, 2010).

Die jährliche Marktproduktion an Zwetschgen in Deutschland wurde 2002 auf 80.000 t geschätzt (Winter und Link, 2002). Die Zwetschgenerzeugung lag damit hinter dem Apfel auf dem zweiten Platz. Das Hauptanbaugebiet für Zwetschgen in Deutschland liegt in der Region Mittelbaden im nördlichen Baden-Württemberg zwischen Offenburg und Baden-Baden. Der Anbau der „Bühler Zwetschge“ hat hier Tradition und ist ein Teil der regionalen Identität und Kultur. Das zweitgrößte Anbaugebiet liegt am Bodensee. Mit einer Gesamtanbaufläche von ca. 2.100 ha war Baden-Württemberg mit einem Anteil von mehr als 40 % das bedeutendste Anbaugebiet für Zwetschgen in Deutschland (Fritsch und Hinrichs-Berger, 2011b). Neuere Zahlen aus dem Jahr 2012 belegen jedoch einen kontinuierlichen Abbau der Anbaufläche in Baden-Württemberg. So wurde der Anbau zuletzt von 1.728 ha auf 1.508 ha reduziert (Hartmann, 2012). Die an die Vermarktungsorganisationen gelieferten Früchte sind oft nur wenig haltbar und verderben bereits auf dem Weg zum

Lebensmitteleinzelhandel (Fritsch, 2009a). Seit Jahren treten am Obstgroßmarkt in Oberkirch nach der Anlieferung der reifen Zwetschgen Fäulnisstellen auf, die den Absatz der Ware erschweren. Für die Infektionen werden die Fruchtfäuleerreger *M. laxa* und *M. fructigena* verantwortlich gemacht. Für eine erfolgreiche Vermarktung der Früchte durch eine Erzeugergenossenschaft ist jedoch eine Mindesthaltbarkeit von 6 Tagen ab Pflückdatum notwendig um die Sortierung, Kommissionierung und den Verkauf der Früchte zu realisieren (Fritsch und Hinrichs-Berger, 2011a). Um diese Haltbarkeit zu garantieren wird eine Vielzahl von Maßnahmen vor, während und nach der Ernte empfohlen (Fritsch, 2009b). Zum einen ist es wichtig, im Vorfeld der Saison für Hygiene in der Obstanlage durch Entfernen von Fruchtmumien zu sorgen. Weitere hilfreiche Maßnahmen sind eine gute Standortwahl, die Baumerziehung und Behangregulierung, um eine gute Durchlüftung der Baumkrone zu erreichen. Um das Infektionspotential in der Kultur möglichst gering zu halten, werden bereits zur Blüte Fungizidapplikationen empfohlen (Fritsch, 2009b). Besonders empfindlich ist die Blüte während der Phase „Weiße Knospe“ beziehungsweise während des Ballonstadiums (BBCH 59-61). Grundsätzlich können jedoch alle Blühstadien infiziert werden, weshalb schon ab Knospenaufbruch (BBCH 53) behandelt werden sollte (Fritsch, 2009a). Da Blütenmonilinia bei Zwetschgen nur bei anhaltend feuchtem und nassem Wetter auftritt, sind nur dann die empfohlenen Behandlungen sinnvoll. Für Fruchtinfektionen im Lager sind hingegen schon wenige Niederschlagsereignisse vor und während der Ernte ausreichend (Fritsch und Hinrichs-Berger, 2011a). Da die Früchte mit zunehmender Reife anfälliger für Infektionen durch *Monilinia spp.* werden, werden ab der Umfärbung mindestens zwei Vorerntebehandlungen mit hochwirksamen *Monilinia* Fungiziden empfohlen, wobei die letzte Behandlung möglichst kurz vor dem Pflückzeitpunkt durchgeführt werden sollte, um ausreichend Schutz für Lagerung und Vertrieb zu gewährleisten (Fritsch und Hinrichs-Berger, 2011a). Durch eine schonende, verletzungsarme Ernte bei trockenen Witterungsbedingungen kann der Befallsdruck nach der Ernte ebenfalls verringert werden (Fritsch *et al.*, 2009). Eine anschließend schnelle Kühlung des Erntegutes auf unter 10 °C verzögert das Auftreten von Fruchtfäulnis und verlängert die Haltbarkeit (Fritsch *et al.*, 2009).
In einer Risikoanalyse für die Ausbreitung von *M. fructicola* für die Staaten der Europäischen Union gingen Van Leeuwen *et al.* (2001) davon aus, dass bei einer Etablierung dieser *Monilinia*-Art vor allem Früchte von Pfirsich, Nektarine und Aprikose vor und nach der Ernte von Infektionen mit dem invasiven Organismus betroffen sein würden. Eine Gefährdung für erhöhte Inzidenzen bei Zwetschgen sahen sie jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht. Da *M. fructicola* im Vergleich zu *M. laxa* jedoch eine erhöhte Aggressivität aufweist (Papavasileiou *et al.*, 2015) und durch die sexuelle Phase im Reproduktionszyklus eine schnellere Anpassungsfähigkeit an Umweltbedingungen sowie die Entwicklung von Resistenzen gegen Fungizide besitzt (Van Leeuwen *et al.*, 2001; Michailides *et al.*, 2007), kann durchaus davon

ausgegangen werden, dass dieser Erreger unter geeigneten Bedingungen auch in Deutschland in allen Steinobst-Sorten verheerende Schäden anrichten kann. Der Rückgang des Zwetschgen- und Pflaumenanbaus der letzten Jahre in Baden-Württemberg wurde vor allem auf die Konkurrenz durch zeitgleich angebotene Nektarinen und Pfirsiche zurückgeführt (Hartmann, 2012). Weiter bestehende Vermarktungsprobleme durch eine hohe Anfälligkeit für die Fruchtfäule könnten zu einer weiteren Reduktion der Anbaufläche führen.
Um den erfolgreichen Anbau von Zwetschgen in Deutschland und in weiteren bedeutenden Anbaugebieten zu erhalten, stellt eine Plasmabehandlung ein vielversprechendes Verfahren dar, um die Haltbarkeit der Früchte nach der Ernte zu verbessern. Durch seine besonderen, im Folgenden beschriebenen physikalischen Eigenschaften kann Plasma dazu eingesetzt werden, Mikroorganismen wie *Monilinia spp.* auf der Oberfläche von Obst und Gemüse zu inaktivieren und die Fruchtqualität länger zu garantieren.

1.5 Die Plasmatechnik

Plasma kann neben fest, flüssig und gasförmig als vierter Aggregatszustand beschrieben werden (Leins, 2010). Es wird erzeugt, indem einem Gas durch Anlegung einer Spannung oder in Form elektromagnetischer Wellen wie beispielsweise Mikrowellen, Energie zugeführt wird (Janzen, 1992). Geladene Teilchen können dadurch Energie gewinnen und durch energiereiche Stöße im Gas werden die neutralen Gasteilchen ionisiert. Dadurch treten Elektronen und positive Ionen auf. Das Ergebnis ist ein aktiviertes Gas, welches aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Partikel-Spezies (Molekülen, Atomen, Ionen, Elektronen und Radikalen) besteht (Leins, 2010). Diese Spezies entstehen im Plasma durch zwei hauptsächliche Mechanismen: Zum einen die Ionisation von Molekülen zu Elektronen und Ionen, zum anderen die Dissoziation von Gasmolekülen, wodurch Radikale wie beispielsweise Sauerstoff- und Stickstoffradikale entstehen. Desweiteren werden Moleküle und Atome angeregt und geben infolgedessen Strahlung unter anderem im UV- und Vakuum UV (VUV)-Bereich ab. Im Allgemeinen handelt es sich bei Plasmen demnach um vollständig oder teilweise ionisierte Gase.
Je nach Technik für ihre Erzeugung, können Plasmen in thermische und nicht thermische Plasmen unterteilt werden (Janzen, 2011). Können genügend Stöße zwischen allen Plasmapartikeln stattfinden, so stellt sich ein vollständiges thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Elektronen, Ionen und Neutronen ein. Das bedeutet, dass Elektronen und Ionen des Plasmas in etwa dieselbe Temperatur und Energie besitzen. Die Stoßfrequenz ist hoch, wodurch die Elektronen ihre Energie zugunsten der Ionen abgeben können und so zur Erwärmung verschiedener Moleküle im thermodynamischen Gleichgewicht beitragen. In diesem Fall spricht man von Gleichgewichtsplasmen mit Temperaturen von 10^3-10^4 K und einem hohen Ionisierungsgrad. Kann sich kein vollständiges thermodynamisches Gleichgewicht einstellen, beispielsweise unter

Niederdruck, ist die Rede von einem nicht-thermischen bzw. Nichtgleichgewichtsplasma. In diesem Fall fehlen den Elektronen aufgrund der geringen Dichte die Stoßpartner und sie übertragen bedingt durch das Massenverhältnis nur einen Bruchteil ihrer kinetischen Energie auf die schwereren Gasteilchen. Dadurch liegt die Elektronentemperatur bei etwa 10^4 K, wohingegen die Temperatur von Ionen und Neutronen in etwa Raumtemperatur aufweist (Surowsky *et al.*, 2014a). Der Ionisationsgrad dieser Plasmen ist relativ gering. Bei Atmosphärendruck können nicht-thermische Plasmen durch eine Vielzahl elektrischer Entladungen wie Koronaentladungen (Raizer und Allen, 1997), dielektrisch behinderte Entladungen (DBE; Ehlbeck *et al.*, 2011) und Plasmajets (Schütze et al., 1998) erzeugt werden.

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

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

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

Durch die beschriebenen Eigenschaften eines Plasmas kann dieses für eine Vielzahl von Anwendungen genutzt werden. So können mit einer Plasmabehandlung beispielsweise die

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

1.6 Antimikrobielle Wirkmechanismen einer Plasmabehandlung

UV-Strahlung kann in Komponenten verschiedener Wellenlängen unterteilt werden. Bei einer Wellenlänge von 380-315 nm spricht man von UV-A Strahlung. Strahlung mit einer Wellenlänge von 315-280 nm wird als UV-B Strahlung bezeichnet, UV-C Strahlung reicht von 280-200 nm und darunter, von 200-100 nm wird die Strahlung als VUV Strahlung bezeichnet. Bei Plasmabehandlungen unter Atmosphärendruck spielt Strahlung aus dem VUV-Bereich eine untergeordnete Rolle, da der Großteil davon durch die umgebende Raumluft absorbiert wird (Surowsky *et al.*, 2014a). Die abtötende Wirkung von UV-Strahlung beruht auf der Anregung und der Ionisation von Molekülen, wodurch vor allem organische Kohlenstoffverbindungen aufgelöst werden. In lebenden Zellen sind bei einer Wellenlänge von 230-300 nm (UV-B und UV-C Bereich) vor allem die DNA aber auch Proteine Moleküle, welche die Strahlung absorbieren (Moan und Peak, 1989). Das Absorptionsmaximum der DNA liegt dabei bei etwa 254 nm, das der Proteine bei 280 nm. Die inaktivierende Wirkung von UV-Strahlung in diesem Wellenlängenbereich gegenüber Mikroorganismen beruht dabei primär auf der direkten Schädigung der DNA durch die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-

Dimeren und Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukten (Moan und Peak, 1989; Kielbassa *et al.*, 1997; Sinha und Häder, 2002), seltener kommt es zu Einzelstrangbrüchen oder DNA-Protein-Querverbindungen (Moan und Peak, 1989). Durch Erosionsprozesse wie intrinsische Photodesorption und Ätzen kann UV-Strahlung zudem auf Oberflächenmoleküle wirken (Moisan *et al.*, 2002). Dabei wird die Zellwand durch das photoneninduzierte Aufbrechen kovalenter Bindungen geschädigt wodurch einzelne Wasser- oder Sauerstoffatome aus den organischen Zellwandkomponenten gelöst werden.

Neben der beschriebenen UV-Strahlung kommen in aus trockener Raumluft erzeugtem Plasma vor allem Stickstoffmonoxid (NO)-Radikale vor. In feuchter Luft können zudem dissoziierter Sauerstoff und Hydroxylradikale auftreten (Janzen, 2011; Leins *et al.*, 2012). Detektiert werden diese Moleküle anhand ihrer spezifischen elektromagnetischen Strahlung mithilfe optischer Emissionsspektroskopie, wodurch eine genaue Charakterisierung der einzelnen Plasmabestandteile möglich ist (Janzen, 2011; Leins *et al.*, 2012). Die beschriebenen Radikale schädigen Oberflächen von Mikroorganismen, indem sie mit den Molekülen der Zellwand zu flüchtigen Verbindungen reagieren. So schädigen Hydroxylradikale vorwiegend die ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen, wohingegen die Proteinbestandteile der Zellmembranen durch Sauerstoffradikale oxidiert werden (Laroussi, 2005).

Die beschriebenen Wirkmechanismen wurden bisher vor allem durch Plasmabehandlungen von Bakterienzellen sowie Bakteriensporen gezeigt. Dabei wurden sowohl grampositive wie *Listeria monocytogenes* als auch gramnegative Bakterien wie *Salmonella enterica serovar typhimurium* und *Escherichia coli* eingesetzt (Fröhling *et al.*, 2012a; Ziuzina *et al.*, 2014). Als Beispiel für besonders resistente Bakterienformen wurden auch häufig Sporen von *Bacillus subtilis* für Versuche verwendet (Feichtinger *et al.*, 2003; Tseng *et al.*, 2012; Reineke *et al.*, 2015). Dabei wurde festgestellt, dass die Wirksamkeit einer Plasmabehandlung und ihrer Wirkmechanismen auch von der Beschaffenheit der behandelten Zellen abhängig ist und deutliche Unterschiede in der Sensibilität gegenüber einer Plasmabehandlung bestehen können (Moisan *et al.*, 2001). Aus diesem Grund werden im Folgenden die Eigenschaften von Bakterien- und pilzlichen Zellen genauer beschrieben, um gegebenenfalls Beobachtungen erklären zu können. Eine häufige Methode Bakterien zu klassifizieren ist die Färbbarkeit ihrer Zellwand, wonach sie in grampositive und gramnegative Bakterien gruppiert werden können (Fuchs, 2014). Sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien besitzen eine der Plasmamembran aufgelagerte Zellwand aus Peptidoglykan. Diese ist bei grampostitiven Bakterien jedoch dicker als bei gramnegativen Bakterien. Gramnegative Bakterien besitzen zudem eine der Zellwand aufgelagerte Membran aus Lipopolysacchariden. Laut Baier *et al.* (1992) sind diese aus diesem Grund resistenter gegenüber einer Plasmabehandlung als grampositive Bakterien. Bakteriensporen (z.B. von

Bacillus subtilis) besitzen ebenfalls eine mehrschichtige Zellwand und sind dadurch gegen Hitze, Kälte, Austrocknung, verschiedene Arten von Strahlung und chemische Agentien besonders widerstandsfähig (Fuchs, 2014). Auch Zellen von höheren Pilzen wie *Monilinia spp.* besitzen zusätzlich zur Zellmembran eine außen aufgelagerte Zellwand (Webster und Weber, 2007). Diese Zellwand besteht aus einem Gerüst querverbundener Fasern und einer Matrix aus Gel-ähnlichem oder kristallinem Material. Das Gerüst bildet die innere Schicht der Zellwand, während die Matrix die äußere Wand bildet. Bei Ascomyceten wie *Monilinia spp.* bestehen die beschriebenen Gerüstfasern aus Chitin-Mikrofibrillen, die in der Plasmamembran gebildet und nach außen abgeschieden werden. Die Querverbindungen bestehen aus vielfach verzweigten Glukanen (Glukosepolymeren). Der dritte wichtige Bestandteil der Zellwand sind Proteine, die vielfach durch Zuckermoleküle, vor allem Mannose, modifiziert sind und deshalb auch als Glukoproteine oder Mannoproteine beschrieben werden. Die Zellwände von Hyphen haben eine Dicke von etwa 0,15 µm, die von Konidien eine Dicke von etwa 0,2 µm. Während die DNA in Bakterienzellen frei vorliegt, ist sie in Pilzen von einer weiteren Membran umgeben und liegt in Form von komplexen Zellorganellen, den Zellkernen vor. Pilzliche Zellen enthalten zudem häufig mehrere Zellkerne. Eine Hyphenzelle von *Monilinia spp*. beinhaltet in der Regel 20-30 Kerne. Konidien beinhalten im Durchschnitt etwa 7 Zellkerne (Byrde und Willetts, 1977). Durch den komplexeren Aufbau der pilzlichen Zellen im Vergleich zu Bakterienzellen besteht die Möglichkeit, dass eine Plasmabehandlung bei Pilzen weniger effektiv ist als bei Bakterien. Ähnlich komplex aufgebaute Bakteriensporen von *Bacillus subtilis* konnten jedoch erfolgreich abgetötet werden (Moisan *et al.*, 2002; Feichtinger *et al.,* 2003). Beschrieben wurde hier ein mehrphasiger Inaktivierungsprozess, wobei zunächst die Zellwand und die Zellmembran der Sporen beschädigt wurden und es in der Folge zum Kontakt der DNA mit der im Plasma vorhandenen UV-Strahlung kam (Moisan *et al.*, 2002). Bei Pilzsporen wurde bisher vor allem die Beschädigung der Zellwand durch Ätzen der Oberflächenmoleküle durch Sauerstoffradikale beschrieben. Behandelt wurden dabei Sporen der Gattung *Penicillium* (Park *et al.*, 2004; Hashizume *et al.*, 2015) und von *Candida albicans* (Xiong *et al*., 2010; Ohkawa *et al.*, 2006). Zusätzlich zur beschädigten Zellwand wurden bei *C. albicans* auch Schäden an Membranstrukturen im Zellinneren beobachtet (Xiong *et al.*, 2010).

1.7 Plasma als Nacherntebehandlung gegen *Monilinia spp.* auf Zwetschge

Wie bereits beschrieben ist die Fruchtqualität von Zwetschgen nach der Ernte primär von den Bedingungen vor der Ernte abhängig und kann durch die beschriebenen Kulturmaßnahmen beeinflusst werden (siehe Kapitel 1.4). Da ein Großteil der Früchte jedoch über Genossenschaften und Großmärkte vermarktet wird, ist eine relativ lange Haltbarkeit von etwa sechs Tagen notwendig um das Sortieren, Kommissionieren und Verteilen der Ware an die Händler zu ermöglichen. In dieser Zeit können bei geeigneten

Bedingungen (beispielsweise durch Temperaturwechsel und Kondenswasserbildung auf der Fruchtoberfläche oder in den Verpackungen) latent auf den Früchten vorhandene Infektionen zur Symptombildung führen. Eine weitere Behandlung nach der Ernte, welche einen Großteil der vorhandenen Erreger inaktiviert, würde zu einer verbesserten Haltbarkeit der Früchte führen. In Deutschland sind effektive Nacherntebehandlungen auf Zwetschgen (Fungizidanwendungen) jedoch nicht gestattet (Kittemann *et al.*, 2008). Der Grund sind strenge Rückstandsauflagen des Lebensmitteleinzelhandels. Laut der Verordnung 396 der Europäischen Gemeinschaft aus dem Jahr 2005 liegt der allgemeine höchstzulässige Rückstand an Pestiziden auf Lebens- und Futtermitteln bei 0,01 mg/kg. Eine Plasmabehandlung kann hier eine alternative Möglichkeit der Nacherntebehandlung darstellen. Die Vorteile einer solchen Anwendung werden vor allem in einer hohen Wirksamkeit bei niedrigen Temperaturen, einer gezielten und verbrauchsgerechten Bereitstellung, einer minimalen Beeinflussung der inneren Produktmatrix und einer rückstandsfreien sowie ressourceneffizienten Anwendung gesehen (SKLM, 2012).

1.8 Hypothesen und Fragestellungen dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die grundsätzliche Eignung einer Plasmabehandlung als Nacherntemethode gegen *Monilinia spp*. auf Zwetschge zu überprüfen. Für die Erzeugung des Plasmas wurde ein Mikrowellenplasmabrenner bei Atmosphärendruck verwendet.

Da eine Infektion von Zwetschgen mit *Monilinia spp.* sowohl von Sporen als auch von Myzel ausgehen kann, wurden beide Vegetationsformen des Fruchtfäuleerregers mit Plasma behandelt. Um eine möglichst einfache und zeitsparende Versuchsdurchführung zu erreichen, wurden diese Versuche zunächst auf Modellsubstraten durchgeführt. Dabei wurde angenommen, dass die Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer signifikant verringerten Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten (KbE) führt. Gleichzeitig wurde die für eine Reduktion von mehr als 90 % der Keime benötigte Behandlungsdauer ermittelt.

Für eine praktische Anwendung der Methode muss die Plasmabehandlung auch auf der Frucht zu signifikanten Ergebnissen führen. Deshalb wurden auch mit Sporen und Myzel inokulierte Früchte mit Plasma behandelt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer Verhinderung der Infektion führt.

Eine weitere Hypothese besagte, dass die Wirkungsweise des Plasmas auf einer synergistischen Wirkung aus UV-Strahlung und Radikalen beruht und eine Behandlung des Organismus mit nur einem dieser Plasmabestandteile zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Wirkung führt. Diese Hypothese wurde überprüft, indem die im Plasma vorkommenden Radikale während der Plasmabehandlung von Myzel auf Modellsubstrat durch den Einsatz eines für UV-Strahlung durchlässigen MgF_2 Filters abgeschirmt wurden.

Da es sich bei der Plasmabehandlung um die Anwendung einer physikalischen Methode handelt, wurde zudem davon ausgegangen, dass die Behandlung keine Veränderung der Fruchtqualitätsparameter Farbe, Festigkeit, Zucker, Säure, Vitamin C- und Polyphenolgehalt bewirkt. Überprüft wurde dies durch Analyse der Fruchtqualitätsparameter plasmabehandelter Früchte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollfrüchten.

2. Material und Methoden

2.1 Computerprogramme

In Tabelle 2 sind die für die Erstellung dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme aufgelistet.

Tabelle 2. Detaillierte Auflistung der verwendeten Computerprogramme.

Programm	Verwendung	Firma
Microsoft Office 2007 (Excel, Word)	Datenverarbeitung, Textverarbeitung	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
RefWorks 2.0	Literaturverwaltung	ProQuest LLC, Cambridge, UK
SPSS 21	Statistische Datenauswertung	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
Geminyx III	Integration und Quantifizierung für HPLC	Goebel Instrumentelle Analytik GmbH, Au in der Hallertau
McDAcq 32 control	Integrationssoftware für HPLC	Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Neu-Anspach
Sigma Plot 12.5	Graphische Darstellung der Ergebnisse	Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA

2.2 Material

In Tabelle 3 sind die verwendeten Materialien aufgelistet.

Tabelle 3. Detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien und Gerätschaften.

Material	Modell/Details	Hersteller
Flüssigprobenbeutel	Whirl Pak® 4 oz (~ 118,3 ml)	Nasco, Fort Atkinson, WI, USA
Gaze (Planktonnetz)	Porengröße 105 µm	Ehlert und Partner GbR Niederkassel-Reidt
Magnesiumfluorid	MgF2	Korth Kristalle GmbH, Altenholz
Nylon Filter	40 µm, NY41	Merck Millipore Ltd., Darmstadt
Parafilm®	Parafilm M®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PET-Folie optimont® 501	Polyesterfilm, 175 µm	Bleher Folientechnik GmbH, Ditzingen
Petrischalen 60 mm / 94 mm	Steril, aus PS	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen	Universal	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotilabo Reaktionsgefäße	farblos, 1,5 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sandpapier	Körnung 80	N/A
Spritzenvorsatzfilter Nylon	Perfect Flow®, 0,45 µm	Wicom International GmbH, Heppenheim
Verbandmull	N/A	N/A
Zentrifugenröhrchen	Volumen 15 ml / 50 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.3 Gerätschaften

In Tabelle 4 sind die für die Arbeiten im Labor eingesetzten Gerätschaften aufgelistet.

Tabelle 4. Auflistung der eingesetzten Gerätschaften.

Gerät	Modell/Details	Hersteller
Airbrush-Pistole	HP-200	Conrad Electronic SE, Hirschau
Brutschrank	RUMED Kühlbrutschrank 3101	Rubarth Apparate GmbH, Laatzen
Chromameter	CR300	Konica Minolta Holdings Inc., Marunouchi, Japan
Digitale Feinwaage	ALJ-220-5DNM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Digitale Laborwaage	TE1502S	Sartorius AG, Göttingen
Gefriertrockner	Pio-K-E-W	Dieter Piatkowski Forschungsgeräte, München
Haushaltsentsafter	Design Juicer Advanced	Gastroback GmbH, Hollenstedt
Infrarot Thermometer IGVP	Voltcraft® IR 1200 - 50d	Conrad Electronic SE, Hirschau
Kaffeemühle	Design KM basic	Gastroback GmbH, Hollenstedt
Kugelmühle	N/A	Retsch GmbH, Haan
Magnetron	2 kW	Muegge GmbH, Reichelsheim
Mikroskop	Axiolab drb KT	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrowellen-Plasmabrenner	publiziert in Leins *et al.*, 2015	Eigenbau IGVP Universität Stuttgart
Mikroliterzentrifuge	Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Penetrometer	Fruit Texture Analyser	Güss Manufacturing (Pty) Ltd., Strand, Südafrika
Pipetten	Pipetman Neo	Gilson S.A.S., Villeirs le Bel, Frankreich
Refraktometer	PR 32α	Atago Co., Ltd., Tokio, Japan
Spektralphotometer	U-2001	Hitachi Ltd. Corporation, Tokio, Japan
Sterilbank	KR105 Laminar Flow	Kojair Tech OY, Vilppula, Finnland
Thoma Zählkammer	N/A	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Tischzentrifuge	5418	Eppendorf AG, Hamburg
Titrierroboter	702 SM Titrino	Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt
Ultra Turrax®	T25 basic / T10 basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Ultrazentrifuge	Heraeus Biofuge Stratos	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA

2.4 Chemikalien und Medienzusätze

In Tabelle 5 sind die verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 5. Auflistung der für die durchgeführten Versuche verwendeten Chemikalien.

Produkt	Beschreibung	Hersteller
Agar-Agar	Kobe I pulverisiert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ameisensäure	CH_2O_2, Analysegrad >95 %	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Aprikosen	Konserviert, halbiert, geschält	Edeka AG & Co. KG, Hamburg
Casein-Hydrolysat	Standard, säurehydrolysiert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
$CaCl(H_2O)_2$	Calcium Chlorid Dihydrat >99 %	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Ethanol vergällt	96 % Ethanol, 1 % MEK	Brüggemann Alcohol, Heilbronn
Flavon	Zur Verwendung als Standard	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Flüssiger Stickstoff	N_2	Sauerstoffwerk Friedrichshafen GmbH
Glukose	D (+), wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerin	99,5 % p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Pulverisiert für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Metaphosphorsäure	HPO_3, 65 %	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
KCl	> 99 %, für die Molekular-biologie	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Methanol p.a.	CH_4O (MeOH)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
NaCl	> 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PDA (Difco™)	Basispulver für Agar	Becton, Dickinson and Company, int., Franklin Lakes, NJ, USA
PDB	Basispulver für Flüssigmedium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Streptomycin-Sulfat	Bakterizides Antibiotikum, ~95 %	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Tween® 20	Nichtionisches Detergens	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ascorbinsäure L (+)	$C_6H_8O_6$, > 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.5 Kultivierung von *Monilinia spp.* im Labor

Für alle Versuche mit Myzel und Sporen wurde das *Monilinia laxa* Isolat M1D2E1 verwendet. Es stammt aus der Sammlung des Fachgebiets Phytopathologie an der Universität Hohenheim (UoH). Mit diesem Isolat konnten zuverlässig Sporen gewonnen werden. Zudem handelt es sich im Gegensatz zu *Monilinia fructicola* nicht um einen Quarantäneorganismus, was die Arbeit an den verschiedenen Versuchsstandorten KOB, IGVP und UoH erleichtert hat. Die Inkubation der Kulturen erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei 23 °C mit einer Lichtperiode von 14 Stunden. Diese Bedingungen wurden sowohl für die Inkubation der Vorratskulturen als auch für die Kultivierung von Versuchs- und Sporulationskulturen gewählt.

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

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

Zur Ernte der Konidien wurden die Agarplatten aus der Glasschale genommen und mit 5 ml steriler Ringerlösung[1] geflutet. Die Suspension der hydrophoben Sporen wurde erleichtert, indem der Lösung 0,1 % v/v Tween® 20 (Ringerlösung + Tween) zugesetzt wurden. Durch vorsichtiges Schaben mit einer Lanzettnadel und Schwenken der Platten wurden die Konidien gelöst. Für die Gewinnung einer reinen Sporensuspension ohne Myzelfragmente wurde die Suspension durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 40 µm (Merck Millipore Ltd., Darmstadt) filtriert. Zur Langzeitlagerung wurde die Sporensuspension in

[1] Die detaillierte Zusammensetzung ist im Anhang aufgelistet.

1,5 ml Reaktionsgefäßen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bei 8.609 rcf für 2 Minuten zentrifugiert und die Ringerlösung durch 1 ml Einfriermedium für Konidien (nach Wirsel *et al.*, 2001)[2] ersetzt. Mithilfe einer Thoma-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) wurde vor dem Einfrieren die Anzahl der Konidien pro ml der gewonnenen Suspension bestimmt. Um Schäden beim Gefriervorgang zu verhindern, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert. Ebenso verfahren wurde mit Myzelkulturen für die dauerhafte Lagerung des Organismus. Myzelstücke aus Flüssig- oder Plattenkulturen wurden hierfür in 25 %igem Glycerin (Einfriermedium für Myzel nach Marquenie *et al.*, 2003)[2] bei -80 °C aufbewahrt.

2.6 Zwetschgensorten und Modellsubstrate

Für die Plasmabehandlung von Myzel und Konidien wurden PDA Platten als Modellsubstrate verwendet. Da Zwetschgen nicht das ganze Jahr über verfügbar sind, sollten diese Substrate zunächst den grundsätzlichen Nachweis einer Abtötung von *M. laxa* ermöglichen. Zudem war auf diese Weise eine schnelle und einfache Versuchsdurchführung möglich. Die Platten wurden jeweils durch Ausplattieren oder Auftropfen einer Myzel- oder Sporensuspension inokuliert. Der Nachweis einer Plasmawirkung erfolgte durch die Bestimmung der Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KbE), welche sich aus den vereinzelt auf der Platte vorliegenden Hyphen oder Konidien bildeten. Diese wurden mit der Anzahl KbE unbehandelter Kontrollen verglichen.

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

Für Versuche mit Zwetschgen wurden die in der Obstanlage des KOB kultivierten Sorten Hanita, Katinka, Hauszwetschge und Hanka verwendet. Je nach Verfügbarkeit wurden die Früchte frisch geerntet, im Kühllager zwischengelagert oder unter kontrollierter Atmosphäre

[2] Die detaillierte Zusammensetzung ist im Anhang aufgelistet.

(O_2: 1-2 kPa; CO_2: > 15 kPa; Temperatur: 1,0 °C) für einige Wochen aufbewahrt. Durch den unterschiedlichen Reifezeitpunkt dieser Sorten und die Lagermöglichkeiten, waren von Juli bis November Früchte für Versuche verfügbar.

2.7 Herstellung von Inokulum und Inokulation der Modellsubstrate

Eine Myzelsuspension wurde aus einer *M. laxa* Flüssigkultur hergestellt, die etwa 7-14 Tage in 50 ml PDB kultiviert wurde. Dafür wurde das Myzel mithilfe zweier Pinzetten in kleinere Stücke gezupft. Diese wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 5 ml Ringerlösung überschichtet. Mithilfe eines Ultra-Turrax® (t10 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen) wurden die Myzelstücke bei maximaler Umdrehungszahl für etwa 30 Sekunden homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 10 ml Ringerlösung wurde das Homogenat in drei Schritten gefiltert, um möglichst kleine Hyphenfragmente einheitlicher Größe zu gewinnen: 1. Entfernen grober Stücke mithilfe von Verbandmull (keine Herstellerangaben und Produktdetails verfügbar), 2. Weitere Verfeinerung der Suspension durch Filtration durch Gaze mit einer Porengröße von 100 µm (Ehlert und Partner GbR, Niederkassel-Reidt), 3. Gewinnung der kleinsten Fragmente durch Filtration der Suspension durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 40 µm (Merck Millipore Ltd., Darmstadt). Für die Reproduzierung der Anzahl der Hyphenfragmente in einer Suspension wurde die optische Dichte der Myzelsuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) in einem Spektralphotometer (Hitachi Ltd., Corporation, Tokio, Japan) in Duplikaten gemessen. Der Mittelwert diente als Richtwert für den Gehalt an Hyphenfragmenten bei der Herstellung der Suspensionen. Der OD-Wert wurde wenn nötig durch Verdünnen auf einen Wert von etwa 0,8 eingestellt. Von der Suspension wurden je nach Plattengröße 100 µl, beziehungsweise 50 µl mithilfe eines Trigalskispatels ausplattiert. Bis zur Plasmabehandlung wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank gelagert, um das Wachstum der Hyphen zu hemmen.

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

2.8 Inokulation von Zwetschgen

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

Abbildung 4. Mit Sandpapier verletzte Zwetschgenoberfläche.

Die Fruchthaut wurde durch 4 - 5 maliges Abreiben mit Sandpapier aufgeraut, sodass deutliche Rillen in der Fruchthaut sowie das Fruchtfleisch sichtbar wurden.

Zusätzlich wurde die Infektion an intakten Früchten getestet. Um eine weitere Verbesserung der Infektionsbedingungen zu erzielen, wurden Sporen vor der Inokulation in einer definierten Zuckerlösung[3] vorkonditioniert. Dieser Ansatz stammt aus einem Protokoll für optimale *in-vitro* Infektionsbedingungen für *Botrytis cinerea* auf intakten Pflanzenteilen (Benito *et al.*, 1998). Demnach sind Glukose und Phosphat essentielle Bestandteile eines Inokulums für eine erfolgreiche Infektion. Nach der Inokulation und einer darauf folgenden Plasmabehandlung wurden die Früchte bei Raumtemperatur und Tageslicht (14 h) bis zur Symptombildung (etwa 7 Tage) in sterilen Kunststoffbehältern inkubiert. Die Auswertung erfolgte qualitativ und fotografisch sowie quantitativ durch Messung des Läsionsdurchmessers.

2.9 Plasmabehandlungen

Die Plasmabehandlungen wurden mit einer Atmosphärendruck-Mikrowellen-Plasmaquelle durchgeführt, die am IGVP an der Universität Stuttgart entwickelt wurde (Abb. 4; Leins *et al.*, 2012; Leins *et al.*, 2015). Die beschriebenen Bauteile des Plasmabrenners stammen von der Firma Muegge GmbH in Reichelsheim. Der Brenner basiert auf einem axial symmetrischen Resonator, welchem über einen Hohlleiter Mikrowellen mit einer Frequenz von 2,45 GHz zugeführt werden. Hat sich ein ausreichend starkes elektrisches Feld gebildet, zündet das

[3]Die detaillierte Zusammensetzung ist im Anhang aufgelistet.

Plasma ohne zusätzliche Zündungsvorrichtungen. Die Mikrowelle wird dabei von einem Magnetron erzeugt. Um das Magnetron zu schützen, wird die reflektierte Mikrowellenenergie in einem Zirkulator mit Wasserlast abgefangen, während durch einen 3-Stift-Tuner die vorwärtsgerichtete Energie maximiert wird. Das Plasma wird durch ein für die Mikrowellen durchlässiges Quarzrohr begrenzt. Durch eine Metalldüse im Zentrum des Resonators wird das Arbeitsgas zugeführt. Zusätzliche tangentiale Luftzufuhr lokalisiert das Plasma in der Mitte des Quarzrohres und gewährleistet einen stabilen Betrieb.

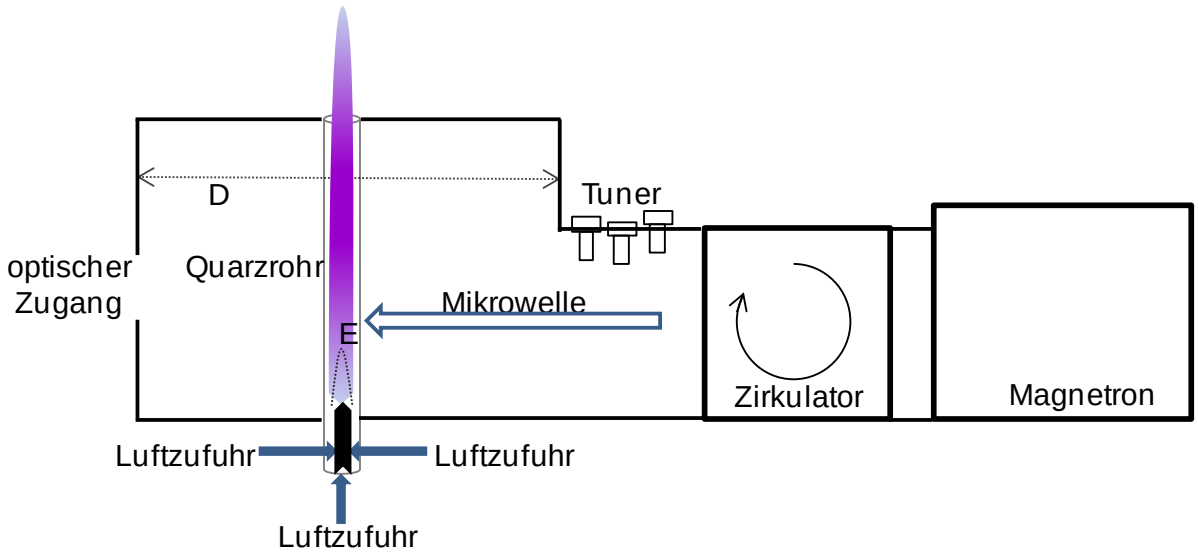

Abbildung 5. Schematische Darstellung des Mikrowellen-Plasmabrenners.

Der Durchmesser des Resonators (D) ist exakt auf die Mikrowellenfrequenz abgestimmt, sodass die Mikrowelle darin hin und her schwingt. An der Düsenspitze im Zentrum des Resonators bildet sich ein elektrisches Feld (E), welches zur Zündung des Plasmas führt.
Die Plasmaflamme erreicht im Kern Temperaturen bis 3.500 K (Leins, 2010). Im austretenden Plasma wurden dann noch Temperaturen von einigen 100 °C bis 1.000 °C gemessen. Aus diesem Grund wurde für die Behandlung der inokulierten Substrate nicht die Flamme selbst, sondern das effluente Plasmagas (Afterglow) oberhalb der Flamme verwendet. Damit wird die unsichtbare Wolke aus Plasmamolekülen und Strahlung bezeichnet, die sich oberhalb der Plasmaflamme ausdehnt. Im Bereich des Afterglow wurden die jeweiligen Substrate an speziellen Halterungen „kopfüber“ fixiert, um den Kontakt mit den Molekülen zu ermöglichen. Dabei betrug der Abstand zwischen Substratoberfläche und der Düse 23 cm. Die freistehende Plasmaflamme erreicht eine Höhe von wenigen Zentimetern. Alle im Folgenden beschriebenen Plasmabehandlungen wurden, sofern nicht abweichend beschrieben, unter identischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde als Arbeitsgas Raumluft mit Φ = 20 slm (20 % bei 1 bar Vordruck) zugeleitet, die Leistung der Mikrowelle betrug P_{MW} = 1 kW. Als Düse wurde eine wabenförmige Düse verwendet, wodurch die

Plasmaflamme großflächiger, kürzer und homogener ausgestoßen wurde. So wurde eine homogene Behandlung einer möglichst großen Fläche gewährleistet. Das Kupfermaterial der Düse sorgt für eine Kühlung des austretenden Gasstroms. Die Zentrierung der Plasmaflamme erfolgte mithilfe eines Pappzylinders (Abbildung 6C). Dieser vermindert die Verwirbelung des Teilchenstroms durch die Umgebungsluft, wodurch möglichst viele Teilchen das Substrat erreichen können. Um die Temperatur der Substratoberfläche während der Plasmabehandlungen zu beobachten, wurde diese in regelmäßigen Abständen mit einem Infrarot-Thermometer (Voltcraft® IR 1200-50d, Conrad Electronic SE, Hirschau) gemessen.
Mit Myzel oder Konidien inokulierte Agarplatten wurden mittels doppelseitigen Klebebands an Metallplatten geklebt, welche an einem Stativ über der Flamme festgeschraubt werden konnten (Abbildung 6A). Für die Behandlung von Konidien auf PET-Folien wurden die Folien auf Metallplatten mit rechteckiger Aussparung befestigt um zu vermeiden, dass die Folie einen direkten Kontakt mit dem Metall hat. Zwetschgen wurden für die Plasmabehandlung mittels Unterdruck an einer Ansaugvorrichtung befestigt (Abbildung 6B). Der Unterdruck wurde hierfür mithilfe eines Luftverdichters erzeugt.

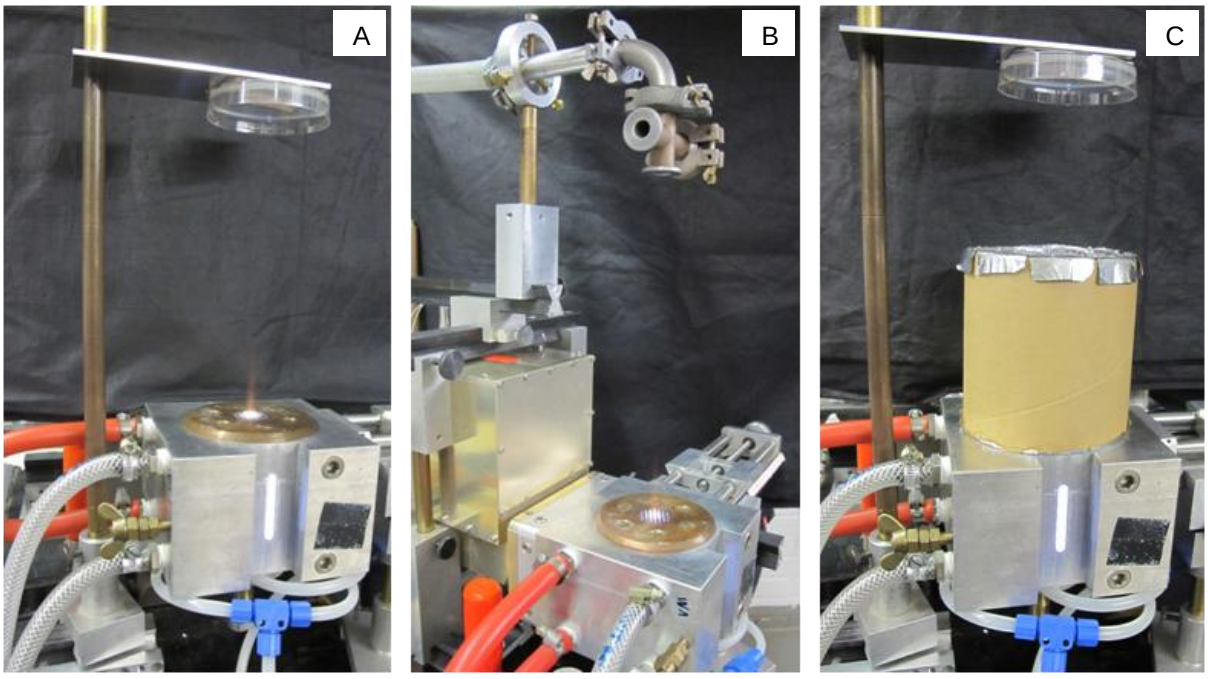

Abbildung 6. Vorrichtungen zur Plasmabehandlung.

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

Durch die Gastemperatur des Plasmas konnte eine Erwärmung der Substrate nicht vollkommen verhindert werden. Der Agar auf den Platten konnte diesen Wärmeeintrag gut kompensieren und ableiten. PET-Folien und Zwetschgen wurden jedoch im Laufe der Plasmabehandlung zu warm. Deshalb wurden Maßnahmen zur Kühlung ergriffen. Die PET-Folie wurde auf ihrer Rückseite mit einem Alkoholfilm versehen. Wasser hat sich hier als

nicht ausreichend kühlend erwiesen. Für die Kühlung der Ansaugvorrichtung der Zwetschgen wurde diese mit einem angefeuchteten Tuch umwickelt. Damit die Zwetschgen selbst nicht zu warm wurden, wurden nach Möglichkeit gut gekühlte Früchte für die Versuche eingesetzt.

2.10 Bestimmung der Fruchtqualität nach der Plasmabehandlung

Um mögliche Auswirkungen der Plasmabehandlung auf die Qualität der Zwetschgen zu überprüfen, wurden ganze Zwetschgen mit Plasma behandelt und anschließend die Qualitätsparameter Farbe, Festigkeit, Säure, Zucker, Vitamin C und der Gehalt an Polyphenolen überprüft. Hierfür wurden die Zwetschgen 2,5 Minuten einseitig mit Plasma behandelt. Für die Fruchtqualitätsanalysen wurde dann die behandelte Fruchthälfte verwendet. Ein Teil der für die Qualitätsanalysen eingesetzten Fruchthälften wurde in kleinen Stücken in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -28 °C in Dunkelheit gelagert, um später für den Nachweis von Vitamin C und Polyphenolen verwendet zu werden. Zur Untersuchung der Qualitätsparameter wurden je Variante 3 Wiederholungen mit jeweils mindestens 7 Früchten, also einem Minimum von insgesamt 21 Zwetschgen verwendet. Nach der Plasmabehandlung wurden die Früchte für einen Zeitraum von 5-8 Tagen bei 1 °C im Kühlraum des Obstlagers gelagert, um auch verzögert auftretende mögliche Wirkungen der Plasmabehandlung erfassen zu können. Dabei war die exakte Lagerdauer vom äußeren Zustand der Früchte abhängig: Die Qualitätsanalyse wurde durchgeführt, bevor die Früchte zu weich wurden. Die Fruchtqualitätsanalyse erfolgte demnach direkt nach der Ernte, am Tag der Auslagerung (in der Regel einen Tag vor der Plasmabehandlung) sowie entsprechend 5-8 Tage nach der Plasmabehandlung.

Die einseitige Behandlung der Früchte war unvermeidlich, da durch eine Erhitzung der Halterung die Fruchthaut in diesem Bereich beschädigt wurde. Da für jede Variante eine verhältnismäßig große Anzahl Früchte behandelt werden musste, wurden die Früchte 2,5 Minuten behandelt. Um zu zeigen, dass diese Art der Versuchsdurchführung im Vergleich zu einer 5-minütigen oder einer beidseitigen Behandlung der Früchte nicht zu abweichenden Ergebnissen führt, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, in welchem diese Varianten mit einer 2,5-minütigen, einseitigen Behandlung verglichen wurden. Zudem wurde untersucht, ob die Fruchttemperatur einen Effekt auf die Plasmawirkung hat.

Die Bestimmung der Grundfarbe der Zwetschgen erfolgte mithilfe eines Chromameters (CR300, Konica Minolta Holdings Inc., Marunouchi, Japan). Die Einzelmessung wurde dabei jeweils an der am dunkelsten gefärbten Stelle der Frucht durchgeführt. Zuvor wurde die Beduftung an dieser Stelle mit einem Papiertuch abgerieben. Die gemessene Farbe wird dabei mit drei Koordinaten beschrieben (Abbildung 7): Farbton, Helligkeit und Sättigung. L gibt die Helligkeit wieder, mit a und b werden Farbton und Sättigung angegeben. Desweiteren kann die Farbe durch den h-Wert angegeben werden. Dieser stellt den sogenannten Bunttonwinkel dar, ein Maß für den Buntton der Fruchtschale beginnend mit 0°

für Rot, über 90° für Gelb, zu 180° für Grün und 270° für Blau. Zur Verrechnung und Darstellung der Farbwerte wurde der h-Wert verwendet. Der h-Wert stellt den Winkel zur a-Achse dar.

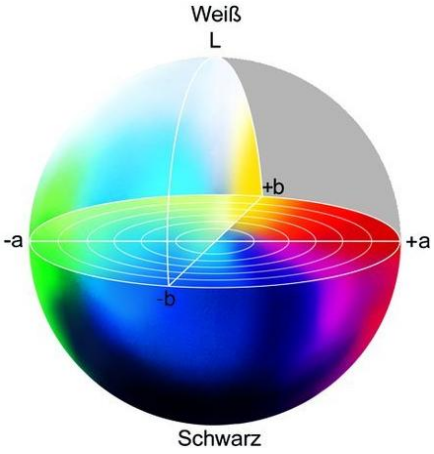

Abbildung 7. Grafische Darstellung des Lab-Farbraumes.

Bildquelle: http://www.heise.de/foto/artikel/Immer-noch-exotisch-L-a-b-228542.html (Stand 17.11.2015).

Die Messungen der Fruchtfleischfestigkeit erfolgten nach der Magnus Taylor Methode mit einem halbautomatischen Penetrometer (Fruit Texture Analyser, Güss Manufacturing (Pty.) Ltd., Strand, Südafrika). Dazu wurde ein Stempel mit einer Fläche von 1 cm² 5 mm tief ins Fruchtfleisch gedrückt. Die Ergebnisse werden in kg / cm² angegeben.

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

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

2.10.1 Bestimmung des Vitamin C-Gehalts

Bei allen beschriebenen Schritten wurden die Proben vor Licht geschützt und gekühlt, um den Abbau des Vitamins zu verzögern. Für die Bestimmung des Vitamin C-Gehalts wurden die gefrorenen Proben zunächst gemahlen und homogenisiert. Dazu wurden diese in einer gekühlten Kaffeemühle (Design KM basic, Gastroback GmbH, Hollenstedt) gemahlen und vom gewonnenen Fruchtpulver jeweils 8-10 g in Schnappdeckelgläser eingewogen. Nach

Zugabe von 15 ml 3 % Metaphosphorsäure (HPO_3) wurden die Proben eine Minute mit einem Ultra Turrax Mixer (T25 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, 13.500 rpm) homogenisiert. Für die Vitamin C-Extraktion aus dem Fruchtgewebe wurden die homogenisierten Proben für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einer Ultrazentrifuge (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 15 Minuten bei 22.132 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reagenzglas überführt und etwa 0,5 ml davon mit einem Spritzenvorsatzfilter aus Nylon (0,45 µm, Perfect Flow®, Wicom International GmbH, Heppenheim) filtriert. Die filtrierten Extrakte wurden bis zur Analyse am nächsten Tag kühl und dunkel gelagert.

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

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

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

2.10.2 Bestimmung des Polyphenolgehalts

Die Analyse der Früchte mittels HPLC konnte mit Nutzung der dortigen Gerätschaften am Lehrstuhl von Prof. Dr. Treutter am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München in Freising durchgeführt werden. Die im Folgenden beschriebene Methode ist in Treutter *et al.* (2012) publiziert.

Bei der Fruchtqualitätsanalyse tiefgefrorene Proben wurden zuvor für eine Woche gefriergetrocknet (Pio-K-E-W, Dieter Piatkowski - Forschungsgeräte, München). In Freising

wurde dieses Material dann mit einer Kugelmühle (Retsch GmbH, Haan) gemahlen (Schwingfrequenz: 60 Hz, 50 Sek.) und die Polyphenole aus 100 mg dieses gemahlenen Materials in 0,8 ml einer Mischung aus Ameisensäure und Methanol (5:95, v/v) im eisgekühlten Ultraschallbad 30 Minuten extrahiert. Als interner Standard dienten 0,05 mg / ml Flavon. Das Lösungsmittel wurde durch Zentrifugation in einer Mikroliterzentrifuge (9.727 rcf, 10 Min.; Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) und einer Vakuumzentrifuge (Univapo 150 H, UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg) vollständig entfernt. Bis zur Analyse wurden die so getrockneten Proben bei -20°C aufbewahrt. Dann wurden sie in Ameisensäure/Methanol (5:95, v/v) zu einer Konzentration von 1,25 g FG (Frischgewicht) / ml Lösungsmittel resuspendiert. 10 µl davon wurden in die HPLC injiziert.
Das HPLC-System besteht aus zwei Pumpen, einem automatischen Einspritzventil und einem Diodenarraydetektor. Für die Derivatisierung und die Detektion von Katechinen und Proanthocyanidinen sind eine weitere analytische Pumpe und ein Detektor hintereinander geschaltet. Der Detektor ist auf eine Wellenlänge von 640 nm eingestellt. Phenolische Verbindungen wurden mittels einer Kinetex Pentafluorphenylsäule (2,6 µm, 150 × 4,6 mm) aufgetrennt und mit 5 % Ameisensäure sowie 95 % Methanol mit einer Rate von 0,5 ml / Min. eluiert.
Für die Berechnung der Peakflächen und die Quantifizierung der Phenole wurde die Software Geminyx-III (Goebel Instrumentelle Analytik GmbH, Au in der Hallertau) verwendet. Für die Quantifizierung wurden die Phenole in drei Kategorien unterteilt und mit entsprechenden Wellenlängen dargestellt: 280 nm (unbekannte phenolische Verbindungen), 320 nm (Hydroxyzimtsäuren, Flavone, acylierte Flavonoide und Flavonole), 540 nm (Anthocyane). Für die Berechnung wurden spezifische Faktoren von Referenzverbindungen zugrunde gelegt. Unbekannte phenolische Verbindungen, Hydroxyzimtsäuren, acylierte Flavonoide und Flavonol wurden als Chlorogensäure, Flavone als Apigenin, Anthocyane als Cyanidin 3-Glykosid berechnet. Die Berechnung der Polyphenolkonzentration erfolgte nach Formel 1 über die spezifische Peakhöhe und Retentionsfaktoren (RF). In diesem Fall ist Chlorogensäure die Referenzverbindung, als Standard wurde Flavon verwendet. Konzentration Standard = 0,05 mg / ml, Verhältnis Phenol / kg TS (Trockensubstanz) = 8. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in mg / kg TS.

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

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

2.11 Charakterisierung des Plasmas

Um die Wirkmechanismen des Atmosphärendruckplasmas genauer charakterisieren zu können wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, in denen während der Plasmabehandlung MgF_2 Plättchen (Magnesiumfluorid, Korth Kristalle GmbH, Altenholz) als optische Filter eingesetzt wurden. Dazu wurde das Plättchen während der Plasmabehandlung mit wärmebeständigem Klebeband auf inokulierten PDA Platten (ø 60 mm) befestigt. Dadurch wurde das Substrat vor den Plasma-Radikalen abgeschirmt. Abbildung 8 zeigt die Transmissionscharakteristika von MgF_2 bei einer Materialstärke von 2 mm. Es ist für 60-95 % der UV-Strahlung durchlässig, wobei die Plasmaradikale bei dieser Methode mechanisch zurückgehalten werden und die Substratoberfläche nicht erreichen.

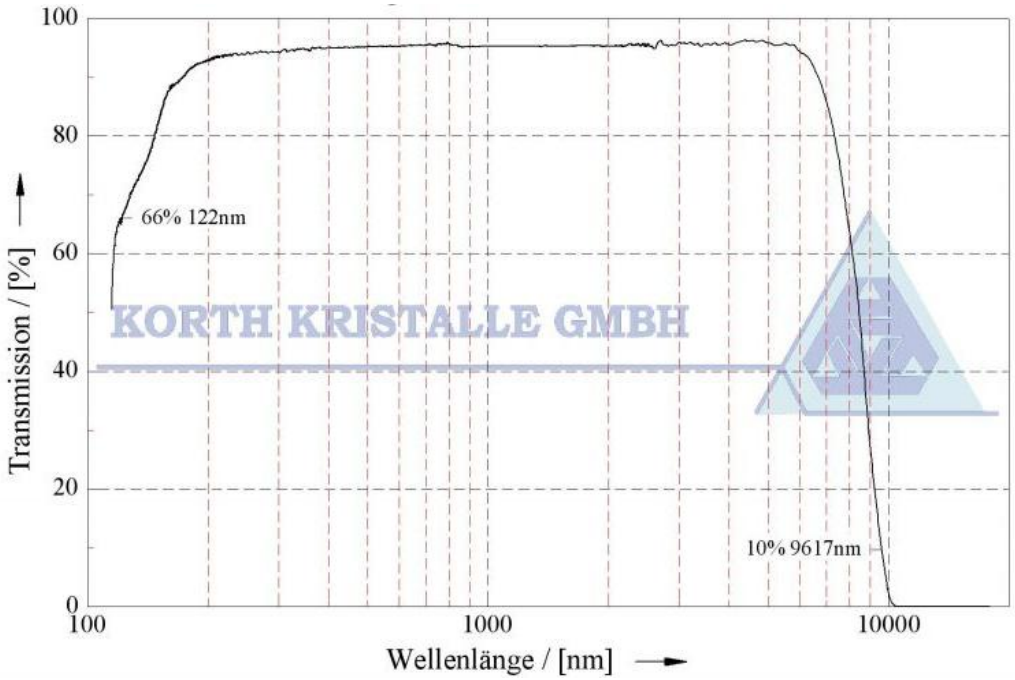

Abbildung 8. Transmissionsspektrum von MgF_2.

Materialstärke 2 mm. Das Material ist für 60-95 % der UV-Strahlung im Bereich zwischen 100 und 600 nm durchlässig (UV-Spektrum 100 nm - 380 nm). Bildquelle: Korth Kristalle GmbH, Altenholz (http://www.korth.de/index.php/material-detailansicht/items/21.html, Stand 19.11.2015).

Behandelt wurden ausplattierte Myzelsuspensionen wie in Kapitel 2.7 beschrieben. Die Auswertung der Varianten unbehandelte Kontrolle, UV-behandelt und plasmabehandelt erfolgte durch Zählen der KbE.

2.12 Auswertung der Daten und Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPPS 21 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen). Als Quelle wurde das SPSS Handbuch Statistik mit SPSS für Windows Version 15 (Diehl und Staufenbiel, 2007) verwendet. Die im Folgenden geschilderten Vorgehensweisen sind, soweit nicht abweichend gekennzeichnet, daraus entnommen. Für die statistische Auswertung der Daten wurden, je nach Anzahl der zu

vergleichenden Varianten, univariate Varianzanalysen oder T-Tests durchgeführt. Statistische Analyseergebnisse werden im Folgenden mittels einer buchstabenbasierten Darstellung verdeutlicht. Dabei werden statistisch nicht signifikante Varianten mit denselben Buchstaben gekennzeichnet.

2.12.1 Univariate Varianzanalyse

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

2.12.2 T-Test

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

3. Ergebnisse

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

3.1 Kontrollbeobachtungen und Vorversuche

3.1.1 Temperaturüberwachung

Da die Plasmabehandlung mit der für die Versuche eingesetzten Plasmaquelle zu einer Erwärmung der Substrate führt, wurde die Temperatur der Substratoberfläche während der Plasmabehandlungen ständig überwacht, um ein übermäßiges Erhitzen auszuschließen. Hierfür wurde die Temperatur in regelmäßigen Abständen mit einem Infrarot-Thermometer (Voltcraft® IR 1200-50d, Conrad Electronic SE, Hirschau) gemessen (Abbildung 9).

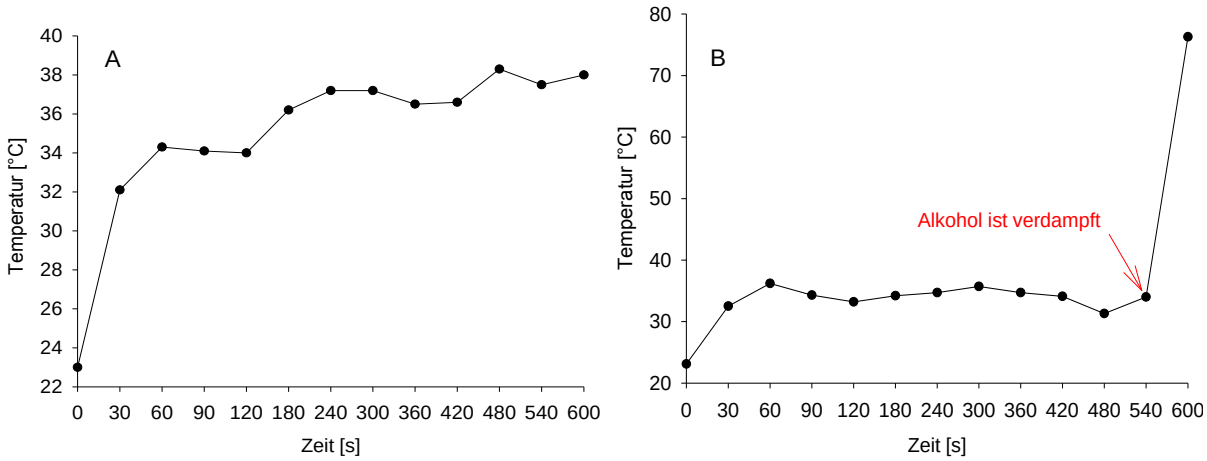

Abbildung 9. Messung der Oberflächentemperatur verwendeter Modellsubstrate.

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

Abbildung 9A zeigt den Verlauf der Temperatur der Oberfläche einer Agarplatte während einer Plasmabehandlung von 10 Minuten. Der Agar erreicht dabei eine Maximaltemperatur von 38,3 °C. Abbildung 9B zeigt den Temperaturverlauf einer mit 70 %igem Alkohol

gekühlten PET-Folie während 10 Minuten Plasmabehandlung. Bis der Alkohol nach etwa 9 Minuten verdampft ist, bleibt die Temperatur der Folie bei maximal 36,2 °C. Danach steigt sie sprunghaft auf 76,3 °C an. Eine PET-Folie kann demnach für eine beliebige Dauer der Plasmabehandlung mit Alkohol gekühlt werden, sofern dieser zwischendurch immer wieder nachgefüllt wird, um den verdampften Anteil zu ersetzen. Eine Agarplatte zeigt durch ihren Wassergehalt demnach eine grundsätzlich bessere Wärmekompensation und dadurch eine deutlich langsamere Erwärmung.

Beide Substrate zeigen einen sprunghaften Anstieg der Oberflächentemperatur von etwa 23 °C auf etwa 32 °C in den ersten 30 Sekunden der Plasmabehandlung. In der folgenden Zeit zeigt der Temperaturverlauf einen deutlich verlangsamten Anstieg bis zum jeweiligen Maximum.

3.1.2 Wärmeeffekt

Da die Substrate während der Plasmabehandlung erwärmt werden, sollte ausgeschlossen werden, dass die Abtötung von Myzel und Konidien auf einem Hitzeeffekt beruht. Um zu zeigen, dass es sich bei der Abtötung von Myzel durch die Plasmabehandlung tatsächlich um einen Effekt des Plasmas und nicht um eine Abtötung durch Hitze handelt, wurden Kulturen von *M. laxa* entsprechend der maximalen Dauer einer Plasmabehandlung für jeweils 10 Minuten in einem Brutschrank Temperaturen von 20, 30, 40 und 50 °C ausgesetzt. Hierfür wurden zuvor 20 µl einer Myzelsuspension auf kleine PDA Platten (ø 60 mm) aufgetropft, beziehungsweise ausplattiert und nach der Wärmebehandlung inkubiert (23 °C, 14 h Licht). Die Auswertung erfolgte nach 2-3 Tagen durch Messung des Myzeldurchmessers oder durch Zählung der KbE. In Abbildung 10A ist der mittlere Myzeldurchmesser der Kulturen nach der jeweiligen Temperaturbehandlung dargestellt.

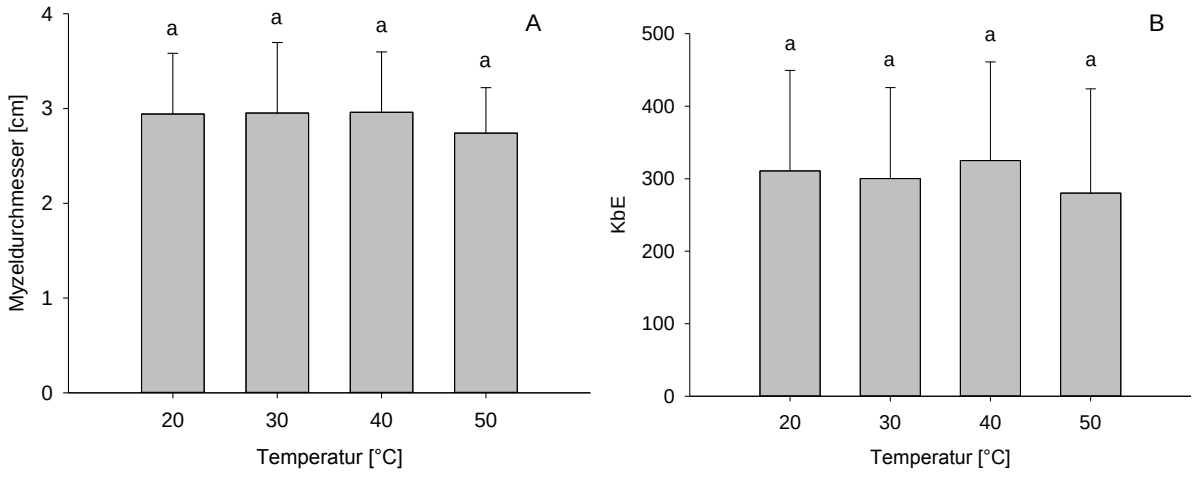

Abbildung 10. Überprüfung eines möglichen Wärmeeffektes auf *M. laxa*.

A: Myzeldurchmesser (n = 18). Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen. B: KbE (n = 12), Einzelwerte aus 2 unabhängigen Versuchswiederholungen. Eine detaillierte statistische Auswertung ist im Anhang aufgelistet.

Die statistische Auswertung der Daten hat ergeben, dass die verschiedenen Temperaturen keine signifikanten Unterschiede im Myzelwachstum bewirkt haben. In der Abbildung 10B ist die mittlere Anzahl KbE dargestellt. Auch hier ergab die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten. Bei nachträglich durchgeführten Versuchen mit Temperaturen bis 80 °C wurde festgestellt, dass erst ab Temperaturen zwischen 60 und 70 °C ein deutlich wachstumsreduzierender Effekt auf das Myzel zu beobachten ist. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine bis zu 10-minütige Plasmabehandlung von Myzel auf Agarplatten möglich ist, ohne den Plasmaeffekt durch eine mögliche Hitzewirkung zu beeinflussen. Die verhältnismäßig größere Standardabweichung bei der Anzahl der KbE ergibt sich aus Schwankungen in der Konidienzahl bei der Ausbringung der verschiedenen Versuchswiederholungen.

3.1.3 Behandlung von Sporen auf PET-Folie

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

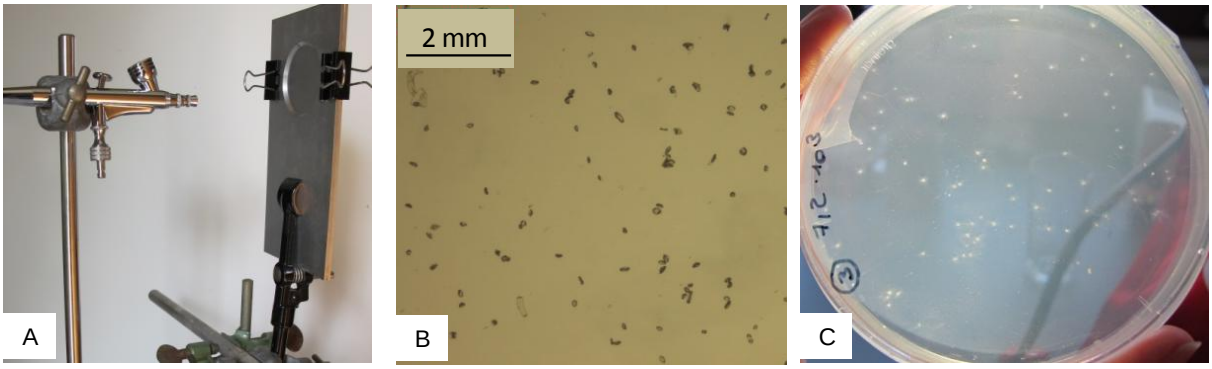

Abbildung 11. Applikationstechnik und Resultat einer Sporensuspension auf PET-Folie.

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

Um die Sporen auf die Folien aufzubringen, wurde eine Airbrushpistole verwendet. Eine Metallschablone gewährleistete dabei eine genaue Applikation der Sporen auf eine definierte Fläche der Folie (Abbildung 11A). Nach der Plasmabehandlung wurden die Sporen mit Ringerlösung (+Tween) durch Schütteln in einem sterilen Flüssigprobenbeutel von der Folie abgelöst. Durch Ausplattieren der so gewonnenen Sporensuspension auf PDA konnten nach 2-3 Tagen Inkubation KbE gezählt werden. In Abbildung 11B ist die Verteilung der Sporen auf

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

3.1.4 Vorversuch zur Plasmabehandlung von Myzel

In Vorversuchen wurde der Effekt der Plasmawirkung auf Myzelsuspensionen untersucht, indem der Durchmesser der aus einem Suspensionstropfen gewachsenen Kultur gemessen und mit unbehandelten Kontrollen verglichen wurde. Diese Methode hat sich als unkompliziert und schnell erwiesen, um einen ersten Eindruck von der Plasmawirkung zu bekommen. Dazu wurde aus einer *M. laxa* Flüssigkultur wie zuvor beschrieben eine Myzelsuspension hergestellt und davon 20 µl auf eine PDA-Platte aufgetropft. Nach dem Trocknen wurden die Platten über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag 5 Minuten mit Plasma behandelt. Die Kontrollplatten blieben dabei unbehandelt. Nach der Plasmabehandlung wurden die Platten im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung des Durchmessers des aus dem Tropfen gewachsenen Myzels mit einem herkömmlichen Lineal. Die verschiedenen Verdünnungen der Myzelsuspension wurden verwendet, um einen möglichen Effekt der Inokulumdichte auf die Plasmawirkung zu untersuchen. Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, ergab sich bei allen drei Verdünnungsstufen der Myzelsuspension nach der Plasmabehandlung ein signifikant kleinerer Myzeldurchmesser im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

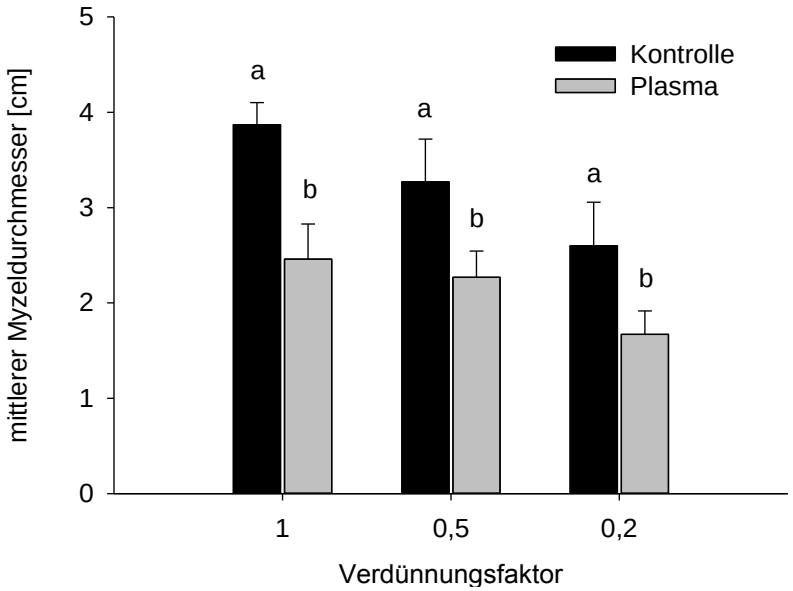

Abbildung 12. Vorversuch zur Plasmabehandlung von Myzelsuspension auf PDA.

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

Anhand dieser Ergebnisse konnte nun von einer grundsätzlichen Wirksamkeit des Plasmas auf das Wachstum von Hyphen ausgegangen werden. Die Reduktion durch die

Plasmabehandlung unterscheidet sich zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen nicht wesentlich. So liegen zwischen den Varianten Kontrolle und Plasma 1,13 cm (1:1, unverdünnt), 0,87 cm (1:2) und 0,90 cm (1:5) Unterschied. Anhand dieser Zahlen ist keine verringerte Plasmawirkung durch eine erhöhte Myzeldichte auf dem Substrat nachzuweisen.

3.1.5 Vorversuche zur Plasmabehandlung von Konidien

In vier Vorversuchen wurde die allgemeine Wirkung einer 5-minütigen Plasmabehandlung auf Sporen untersucht. Eine Sporensuspension wurde wie in Kapitel 2.7 beschrieben hergestellt. Um ein vorzeitiges Keimen der Sporen zu verhindern, wurden diese über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und erst vor Ort am IGVP wurden die Agarplatten (ø 94 mm) durch Ausplattieren von jeweils 100 µl Sporensuspension inokuliert. Dabei wurde darauf geachtet, die Suspension sorgfältig zu verteilen, sodass die Agaroberfläche sofort wieder trocknete. Direkt im Anschluss wurden die Platten dann für 5 Minuten mit Plasma behandelt, wobei die Kontrollen unbehandelt blieben. Nach drei Tagen Inkubation wurde die Plasmawirkung durch Ermittlung der KbE pro Platte überprüft. In Abbildung 13 ist die mittlere Anzahl KbE der beiden untersuchten Varianten, unbehandelte Variante und 5 Minuten Behandlungsdauer, im Boxplot dargestellt.

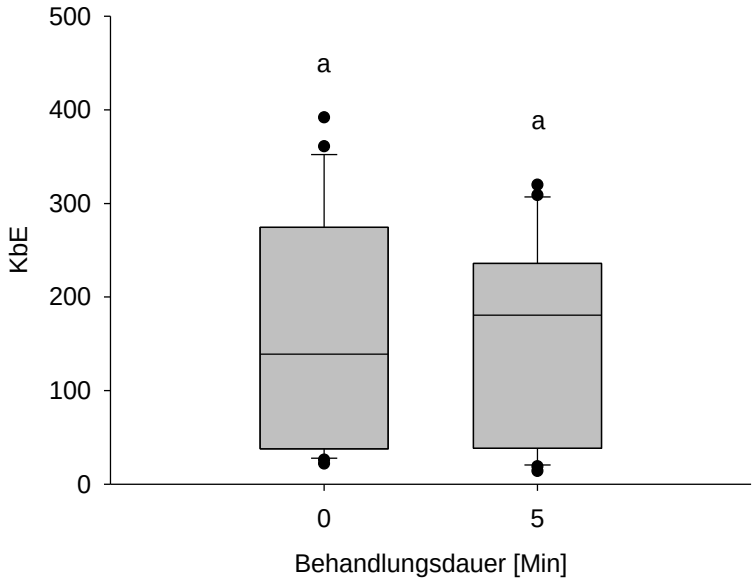

Abbildung 13. Plasmabehandlung von Konidien, Vorversuch.

5 Minuten Behandlungsdauer (n = 24) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n = 22). Dargestellt sind Einzelwerte aus 4 unabhängigen Versuchswiederholungen. Eine detaillierte statistische Auswertung findet sich im Anhang.

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

3.1.6 Künstliche Inokulation von Zwetschgen

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

Wie in Abbildung 14 bei einigen mit einem roten Kreis markierten Früchten zu erkennen ist, führte die Inokulation intakter Früchte mit einer Myzelsuspension zu keiner Infektion. Das Myzel zeigte sehr langsames Wachstum kaum über die Tropfengröße des Inokulums hinaus, das nur auf der Oberfläche der Frucht stattfand.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit Sporensuspension auf intakter Fruchthaut erzielt (Abbildung 15). Das oberflächliche Myzelwachstum war auch hier, jedoch deutlich schwächer als bei mit Myzelsuspension inokulierten Früchten erkennbar. Dabei zeigten sich keine Unterschiede im Infektionserfolg zwischen in Zuckerlösung vorkonditionierten und in Ringerlösung suspendierten Sporen.

Zur Verdeutlichung der mit einem roten Kreis markierten Symptome sind Detailaufnahmen des oberflächlichen Myzelwachstums auf mit Sporensuspension inokulierten Zwetschgen in Abbildung 16 vergrößert dargestellt.

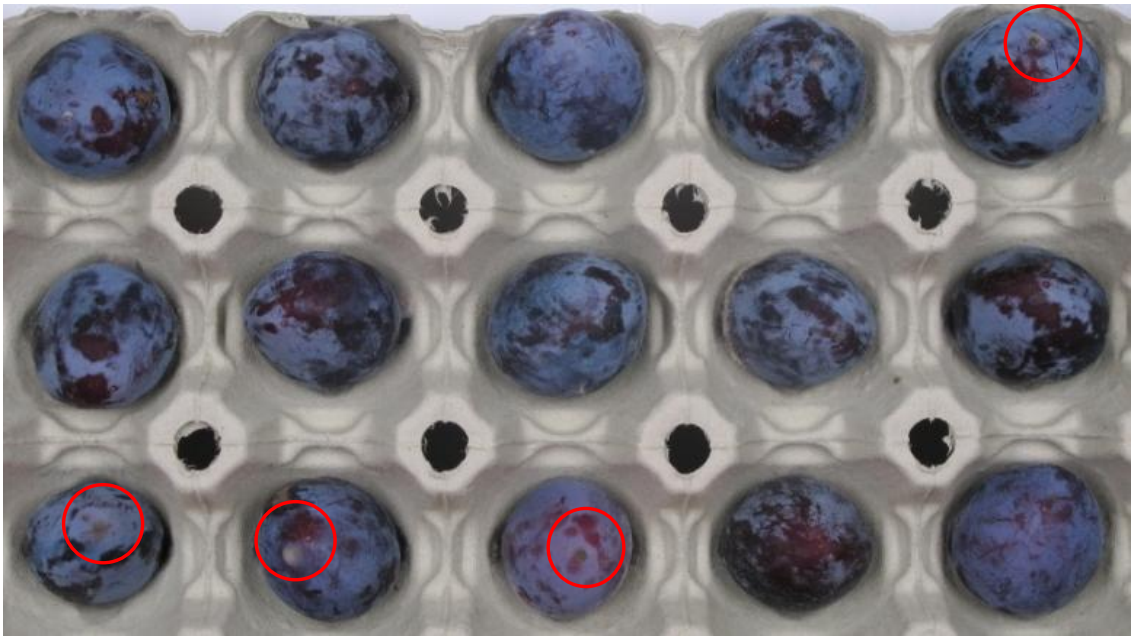

Abbildung 14: Inokulation intakter Früchte mit Myzelsuspension.

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

Abbildung 15. Inokulation intakter Früchte mit Sporensuspension.

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

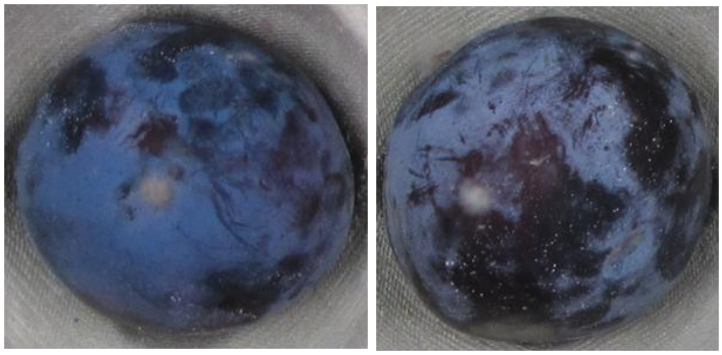

Abbildung 16. Vergrößerter Ausschnitt mit Sporensuspension inokulierter Früchte.

Symptome dieser Art sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 mit einem roten Kreis markiert.

Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigen auf der folgenden Seite, dass die Inokulation mit Sandpapier verletzter Früchte zu besseren Ergebnissen führte. Dabei zeigt Abbildung 17 den Vergleich zwischen Myzelsuspension und Sporensuspension als Inokulum. Abbildung 18 zeigt in Zuckerlösung vorinkubierte Sporensuspension im Vergleich zu Sporensuspension in Ringerlösung. Sowohl mit Myzelsuspension als auch mit Sporensuspension wurde eine Infektion erreicht, jedoch ist erkennbar, dass mit Sporen ein deutlich besseres und einheitlicheres Infektionsergebnis erzielt werden konnte als mit Myzelsuspension. Beim Vergleich vorinkubierter Sporen mit Sporen in Ringerlösung konnte erneut kein Unterschied im Infektionserfolg beobachtet werden.

Abbildung 17. Vergleich von Myzelsuspension und Sporensuspension.

Untere Reihe: mit Myzelsuspension inokulierte Früchte im Vergleich zu mit Sporensuspension inokulierten Früchten (mittlere Reihe) und nicht inokulierten Kontrollfrüchten (obere Reihe). Dargestellt ist eine von drei unabhängigen Versuchswiederholungen.

Abbildung 18. Vergleich zweier Sporensuspensionen.

Verwendet wurden in Zuckerlösung vorinkubierte Sporen (mittlere Reihe) im Vergleich zu Früchten mit Sporen in herkömmlicher Ringerlösung (untere Reihe) und nicht inokulierten Kontrollfrüchten (obere Reihe). Dargestellt ist eine von drei unabhängigen Versuchswiederholungen.

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

3.2 Plasmabehandlung von Myzel

Nach den vielversprechenden Ergebnissen durch eine 5-minütige Plasmabehandlung von Myzelsuspensionen (Kapitel 3.1.4), sollte der genaue Verlauf der Kinetik einer Plasmabehandlung näher untersucht werden. Hierzu wurden die Myzelsuspensionen auf PDA-Platten unterschiedlich lange dem Plasma ausgesetzt: 0; 2,5; 5; 7,5 sowie 10 Minuten, wobei 0 Minuten die unbehandelte Kontrolle darstellte. Ziel dieser Versuchsreihe war es, eine minimale Behandlungsdauer zu bestimmen, bei der eine maximale Abtötungsrate der Hyphen auf der Platte erreicht werden kann. Bewertet wurde die jeweilige Wirkung auf das Wachstum der Hyphen durch zählen der KbE und den Vergleich der jeweiligen Variante mit den unbehandelten Kontrollen. Abbildung 19 zeigt den Einfluss der verschiedenen Behandlungszeiten auf das Wachstum der Hyphen und die daraus resultierende Bildung von KbE als Boxplot. In Abbildung 20 ist die Zeitreihe der Abtötung von Myzel zusätzlich als Kurve dargestellt. Diese Darstellung soll verdeutlichen, dass die Abtötung der Hyphen in drei Phasen verläuft. Zwischen 0 Minuten und 2,5 Minuten verläuft die Kurve recht flach, zwischen 2,5 Minuten und 7,5 Minuten verläuft sie deutlich steiler, um dann zwischen 7,5 Minuten und 10 Minuten wieder etwas flacher zu werden. Dieser sigmoidale Kurvenverlauf war auch in den einzelnen Versuchen jeweils deutlich erkennbar.

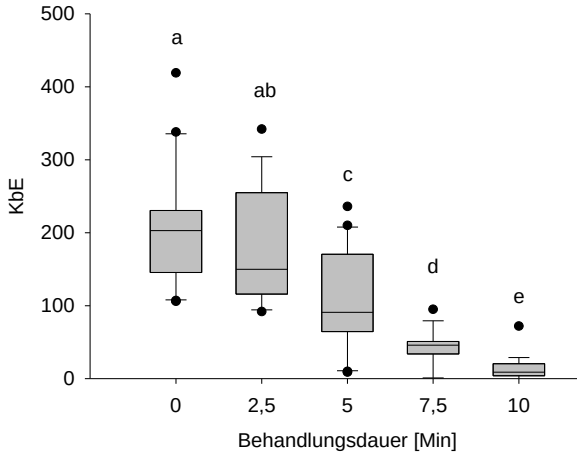

Abbildung 19. Plasmabehandlung von Myzel, Zeitreihe. Darstellung im Boxplot.

Mit 0 (n = 21); 2,5 (n = 15); 5 (n = 21); 7,5 (n = 15) und 10 (n = 21) Minuten Behandlungsdauer. Dargestellt sind Einzelwerte aus 6 unabhängigen Versuchswiederholungen im Boxplot mit Median und Standardabweichung. Detaillierte statistische Ergebnisse sind im Anhang beigefügt.

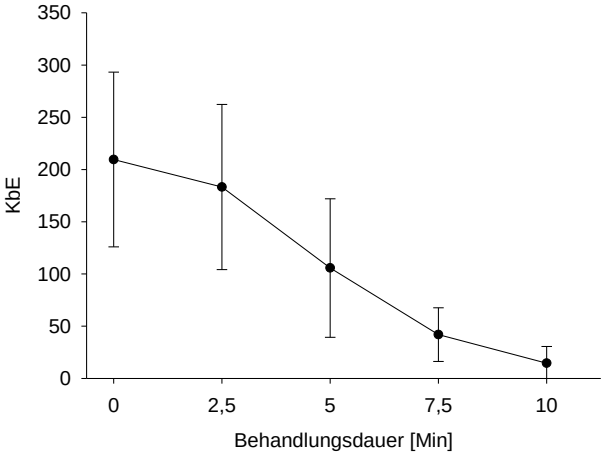

Abbildung 20. Plasmabehandlung von Myzel, Zeitreihe. Lineare Darstellung.

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 6 unabhängigen Versuchswiederholungen mit insgesamt 21 (0 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten) beziehungsweise 15 (2,5 Minuten, 7,5 Minuten) Einzelwerten.

Die Boxplot-Darstellung in Abbildung 19 verdeutlicht, dass die Streuung der einzelnen Werte innerhalb einer Variante relativ groß ist. Dies begründet sich auf der je Versuch unterschiedlichen Ausgangskeimzahl auf den Platten. Über die Messung der optischen Dichte der für den jeweiligen Versuch eingesetzten Myzelsuspension konnte zwar immer ein

in etwa gleicher Wert eingestellt werden, die Praxis zeigte jedoch, dass dieser Wert lediglich zu einem gewissen Grad mit der Anzahl Hyphen in der Suspension korreliert. Vermutlich wird die gemessene optische Dichte nicht nur durch die Hyphen in der Suspension, sondern auch von der Färbung des Myzels durch eingelagertes Melanin beeinflusst. Die Erfahrung hat gezeigt, dass die Braunfärbung des Myzels und damit die der Myzelsuspension immer etwas variiert. Trotz der unterschiedlichen Ausgangszahl an Hyphen auf den Agarplatten war der Kurvenverlauf der einzelnen Versuchswiederholungen jedoch stets vergleichbar. Mit einer Varianzanalyse konnte, verglichen mit der Kontrolle (Median = 203 KbE), nach 5 Minuten Behandlungsdauer (Median = 91 KbE) ein signifikanter Effekt festgestellt werden. In der Folge bewirkte das Plasma ebenfalls signifikante Abtötungsraten im Vergleich zur jeweils vorherigen Behandlungszeit: Der Median liegt nach 7,5 Minuten bei 46 KbE, nach 10 Minuten bei 9 KbE. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Behandlungszeit von 2,5 Minuten (Median = 150 KbE). Nach 10 Minuten Plasmabehandlung ergab sich eine durchschnittliche Abtötungsrate von 92,22 %. Zur Verdeutlichung der Abtötungsraten sind diese in Tabelle 6 gesondert dargestellt.

Tabelle 6. Mittlere Abtötungsrate von Myzel.

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

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

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

3.3 Plasmabehandlung von Konidien

Nachdem eine 5-minütige Plasmabehandlung von Sporen keinen Effekt gezeigt hat (siehe Kapitel 3.1.4), wurde ebenso wie für Myzel, eine zeitabhängige Wirkung des Plasmas

ermittelt. Das Ziel war auch hier, eine maximale Störung der Konidienkeimung mit minimaler Behandlungsdauer zu bestimmen. Auch hier erwies es sich als schwierig, eine konstante Ausgangskeimzahl für die verschiedenen Versuchswiederholungen zu erreichen. Die Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 21 zeigt deshalb eine recht große Streuung der Einzelwerte um den Median. Dennoch waren auch hier die Ergebnisse der einzelnen Versuchswiederholungen in ihrem Verlauf vergleichbar.

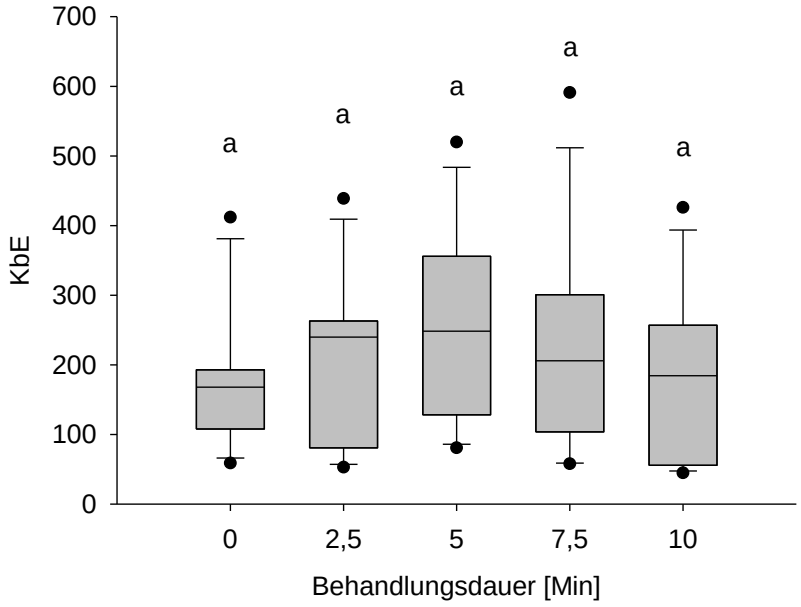

Abbildung 21. Plasmabehandlung von Konidien, Zeitreihe, Darstellung im Boxplot.

Mit 0 (n = 11); 2,5 (n = 11); 5 (n = 12); 7,5 (n = 12) und 10 (n = 12) Minuten Behandlungsdauer. Dargestellt sind Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen. Die detaillierte statistische Auswertung findet sich im Anhang.

Durch Varianzanalyse der Daten konnte gezeigt werden, dass zwischen den einzelnen Mittelwerten keine signifikanten Unterschiede bestehen. Demnach hat die Plasmabehandlung auch nach 10 Minuten Behandlungsdauer keinen hemmenden Einfluss auf die Keimung der Sporen und die Ergebnisse aus den Vorversuchen wurden hiermit bestätigt.

3.4 Plasmabehandlung künstlich inokulierter Zwetschgen

Vorversuche inokulierte Zwetschgen mit Plasma zu behandeln haben gezeigt, dass die Früchte mit dem üblichen Abstand von 23 cm zum Plasmabrenner während 5 Minuten Behandlungsdauer eine Oberflächentemperatur bis zu 45 °C erreichen. Zudem wurde beobachtet, dass die Beduftung bereits bei 36 °C Oberflächentemperatur zu schmelzen beginnt – ein unerwünschter Nebeneffekt. Erst mit einem Abstand von 27 cm blieb die Temperatur der Fruchthaut unter 36 °C. Eine Behandlung von Myzelsuspension von *M. laxa* in verschiedenen Abständen zur Plasmaquelle hat jedoch gezeigt, dass die Wirksamkeit des Plasmas in Abständen größer als 23 cm signifikant abnimmt (siehe Abbildung 22). Die Anzahl KbE ist bei einem Abstand von 25 cm zwischen Probe und Plasmaflamme bereits signifikant höher als bei einem Abstand von 23 cm. Daraufhin wurde der Temperaturverlauf großer und kleiner Zwetschgen sowie gekühlter (Ausgangstemperatur 7 °C) und ungekühlter

(Raumtemperatur) Früchte während einer 6-minütigen Plasmabehandlung aufgezeichnet, um die Erwärmung der Fruchthaut mit diesen Parametern kontrollieren zu können (siehe Abbildung 23).

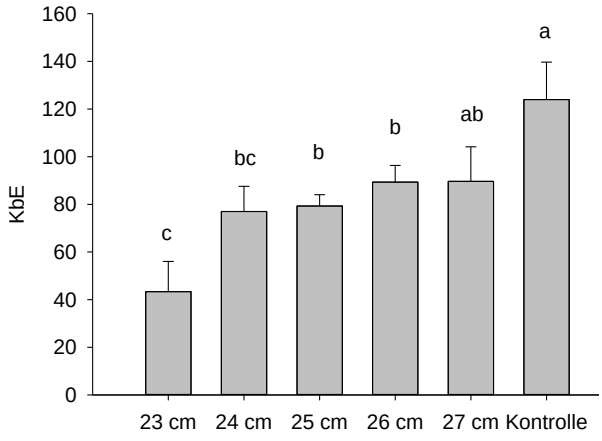

Abbildung 22. Wirkung einer Plasmabehandlung in verschiedenen Abständen zur Plasmaflamme.

5-minütige Plasmabehandlung von *M. laxa* Myzel. Pro Variante n = 3 aus einer Versuchswiederholung. Statistische Auswertung im Anhang.

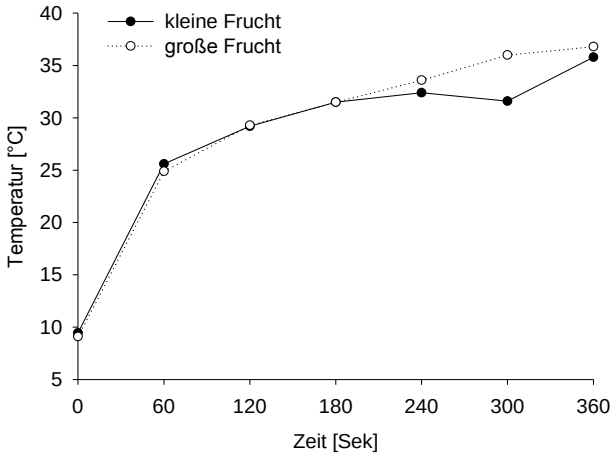

Abbildung 23. Temperaturverlauf großer und kleiner Früchte im Vergleich.

Kleine Frucht: Sorte Hanka (mittlerer Ø 43,2 mm), große Frucht: Sorte Hanita (mittlerer Ø 47,8 mm).

Für die Überprüfung des Größenunterschiedes wurden die verschieden großen Früchte der Sorten Hanka und Hanita verwendet. Die Bestimmung des Fruchtdurchmessers erfolgte durch das Messen des Abstandes zwischen Stielansatz und Fruchtspitze mit einer digitalen Schieblehre. Wie in erkennbar ist, war zwischen „großen“ und „kleinen“ Früchten kein Unterschied im Temperaturverlauf erkennbar.

In Abbildung 24 ist der Temperaturverlauf gekühlter und ungekühlter Früchte dargestellt.

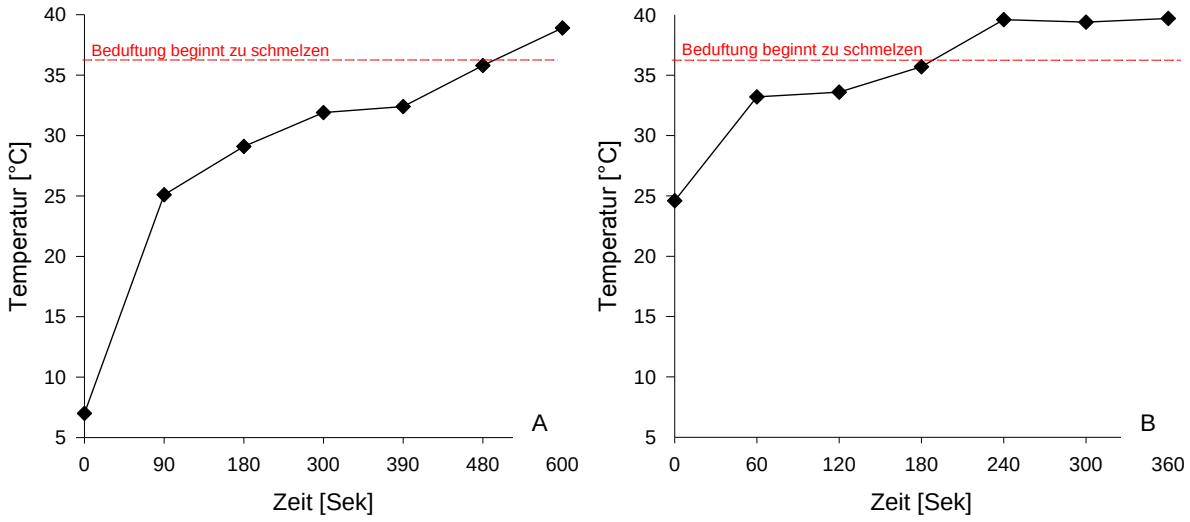

Abbildung 24. Temperaturverlauf der Zwetschgenoberfläche.

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

In Abbildung 24 A ist zu erkennen, dass bei gekühlten Früchten mit einer Ausgangstemperatur von etwa 7 °C vor der Plasmabehandlung die Oberflächentemperatur bei einem Abstand von 23 cm von der Plasmaquelle nach 8 Minuten Behandlung auf etwa 35 °C steigt. Bei Früchten mit Raumtemperatur als Ausgangstemperatur (Abbildung 24 B) steigt die Oberflächentemperatur nach 6 Minuten Plasmabehandlung auf 40 °C.

Eine übermäßige Erwärmung der Fruchthaut kann somit durch die Verwendung gekühlter Früchte vermieden werden. Die Größe der Frucht spielt jedoch bei der Auswahl der Früchte für einen Versuch keine Rolle.

Inokuliert wurden die Früchte nach einer Sterilisation ihrer Oberfläche mit 70 % Ethanol und der Verletzung der Fruchthaut mit Sandpapier, mit je 10 µl einer Sporensuspension. Die Früchte wurden dann im sterilen Kunststoffbehälter über Nacht bei 1 °C gelagert, um ein zu starkes Erwärmen der Fruchthaut während der Plasmabehandlung zu vermeiden. Jeweils fünf Früchte wurden 5 Minuten mit Plasma behandelt sowie je fünf Früchte 10 Minuten. Diese zwei Varianten wurden mit je fünf unbehandelten Kontrollfrüchten in separaten Kunststoffboxen bei Raumtemperatur gelagert. Die Auswertung erfolgte qualitativ (sichtbares Myzelwachstum ja oder nein) und fotografisch sowie quantitativ durch Ausmessen des Läsionsdurchmessers. Nach sechs Tagen zeigte sich auf allen Früchten ein deutliches Myzelwachstum. Optisch konnte jedoch kein Unterschied in der Symptombildung der behandelten Varianten zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Auch zwischen den Behandlungszeiten 5 und 10 Minuten war kein Unterschied erkennbar (Abbildung 41 und Abbildung 42 im Anhang). So zeigen alle Früchte einen deutlich erkennbaren Bewuchs mit Myzel, der sich teilweise auch erkennbar unterscheidet. Jedoch variiert die Stärke der Infektion auch innerhalb der Varianten sichtbar.

In Abbildung 25 ist der mittlere Läsionsdurchmesser der 3 Varianten im Balkendiagramm dargestellt.

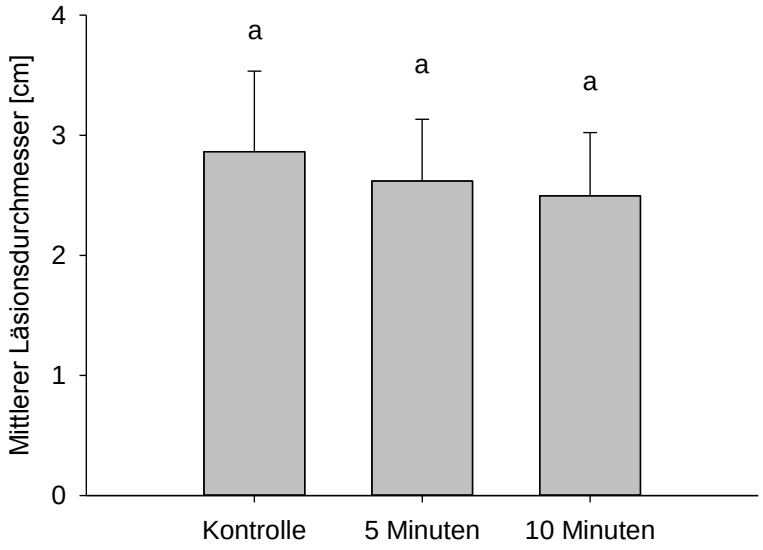

Abbildung 25. Mittlerer Läsionsdurchmesser von *M. laxa* auf Zwetschgen.

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

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

3.5 Fruchtqualitätsanalyse plasmabehandelter Zwetschgen

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

Zusätzlich wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, um zu zeigen, dass die verschiedenen Parameter wie einseitige Behandlung, Behandlungsdauer und die Temperatur der Früchte einen möglichen Plasmaeffekt nicht beeinflussen. Für den Kontrollversuch wurden Früchte der Sorte Hanita verwendet. Verglichen wurden zwei unbehandelte Kontrollvarianten warme (K.w., Raumtemperatur) und kalte (K.k., etwa 10 °C) Früchte mit Variante 1 (kalte Früchte 2,5 Minuten plasmabehandelt), Variante 2 (warme Früchte 2,5 Minuten plasmabehandelt), Variante 3 (einseitige Behandlung 2,5 Minuten wie in den vorangegangenen Versuchen, die Früchte waren mehr oder weniger erwärmt), Variante 4 (beidseitige Behandlung jeweils 2,5 Minuten) sowie Variante 5 (einseitige Behandlung 5 Minuten). Die einzelnen Varianten sind zur Verdeutlichung in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7. Auflistung der im Text beschriebenen Varianten für die Kontrollversuche.
RT: Raumtemperatur (etwa 20 – 23 °C).

Variante	Fruchttemperatur	Behandlungsdauer	Behandlungsweise
K.w.	RT	-	-
K.k.	10 °C	-	-
V. 1	10 °C	2,5 Min	einseitig
V. 2	RT	2,5 Min	einseitig
V. 3	10 °C - RT	2,5 Min	einseitig
V. 4	10 °C - RT	2,5 Min	zweiseitig
V. 5	10 °C - RT	5,0 Min	einseitig

3.5.1 Farbe der Fruchthaut

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

In Abbildung 26 ist der h-Wert für die Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka dargestellt. In der statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte der plasmabehandelten und der unbehandelten Variante auf signifikante Unterschiede überprüft. Die Grafik macht deutlich, dass sich die Farbe der Früchte im violetten Bereich zwischen Blau und Rot befindet. Dabei weist die Hauszwetschge einen etwas höheren Rotanteil auf als die Sorten Hanita und Katinka. Ebenso liegt der Rotanteil bei Katinka etwas über dem der Sorte Hanita.

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

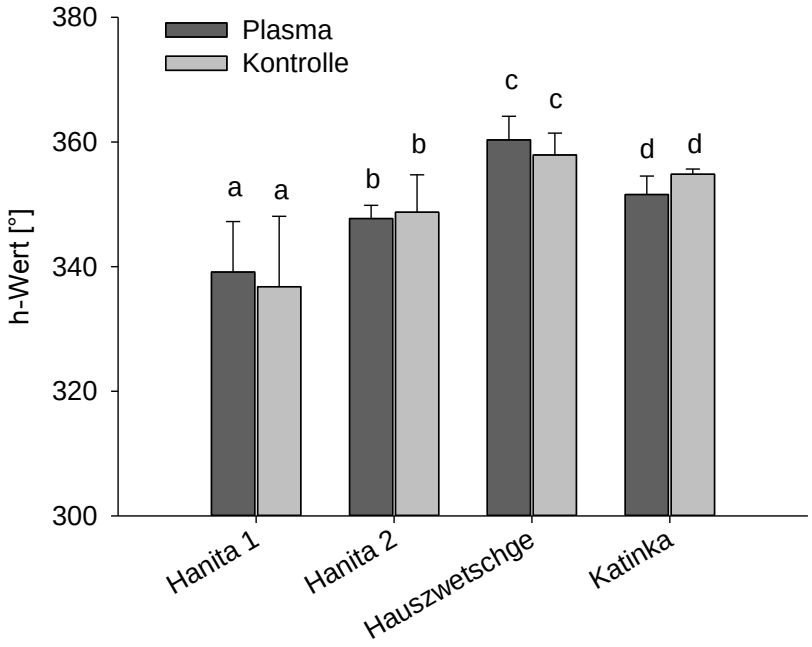

Abbildung 26. Farbe der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Verglichen wurden Werte plasmabehandelter Früchte mit Werten unbehandelter Früchte. Jede Sorte steht als unabhängige Versuchswiederholung. Hanita (1: n = 6, 2: n = 6), Hauszwetschge (n = 6) und Katinka (n = 3). Details zur statistischen Auswertung sind im Anhang beigefügt.

In Abbildung 27 ist der h-Wert der verschiedenen Varianten aus dem Kontrollversuch dargestellt. Untersucht werden sollte hiermit, ob Behandlungsparameter wie die Ausgangstemperatur der Früchte, die Behandlungsdauer oder die einseitige Behandlung Auswirkungen auf das Versuchsergebnis haben.

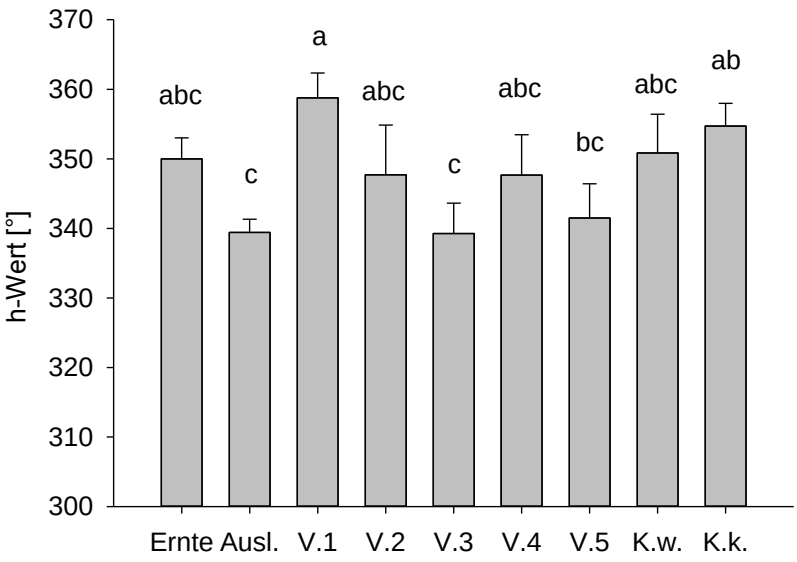

Abbildung 27. Farbe der Fruchthaut der Varianten aus dem Kontrollversuch.

V.1: Variante 1, V.2: Variante 2, V.3: Variante 3, V.4: Variante 4, V.5: Variante 5, K.w.: Kontrolle warm, K.k.: Kontrolle kalt. Jeweils n = 3 Einzelwerte aus einer Versuchswiederholung. Die detaillierte statistische Auswertung findet sich im Anhang.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in dieser Abbildung mit Buchstaben dargestellt. Daran ist zu erkennen, dass sich die Varianten 1 und 3, 1 und 5 sowie 3 und der kalten Kontrolle signifikant voneinander unterscheiden. Da es zwischen den Varianten 1 und 2 jedoch keine nachweisbaren Unterschiede in der Fruchtfarbe gibt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Ergebnis (Variante 1 verglichen mit Variante 3) um zufällige Unterschiede in der Fruchthaut handelt. Dasselbe gilt für den signifikanten Unterschied zwischen Variante 3 und der kalten Kontrolle. Da zur warmen Kontrolle keine Unterschiede bestehen, wird auch hier von einer natürlichen Schwankung in der Fruchtfarbe ausgegangen. Auch der errechnete Unterschied zwischen den Varianten 1 und 5 wird auf natürliche Unterschiede zurückgeführt, da zwischen den Varianten 1 und 4 sowie 5 und 4 keine signifikanten Unterschiede bestehen.

Eine mögliche Erklärung für die genannten „natürlichen“ Schwankungen in der Fruchtfarbe könnte möglicherweise in der Lagerung der Früchte liegen. Während der Lagerung verändern sich die Fruchtinhaltsstoffe ebenso wie die Farbstoff-Zusammensetzung der Fruchthaut, was in Abbildung 27 im Unterschied zwischen den Varianten Ernte und Auslagerung (Ausl.) erkennbar ist.

3.5.2 Fruchtfleischfestigkeit

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

Die Ergebnisse mit statistischer Auswertung sind in Abbildung 28 dargestellt.

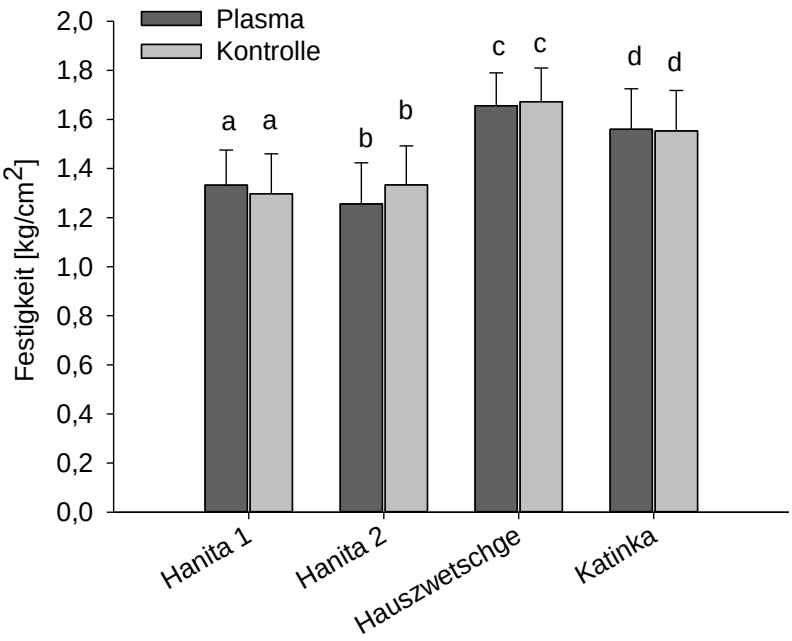

Abbildung 28. Fruchtfleisch-festigkeit der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Verglichen wurden Werte plasmabehandelter Früchte mit Werten unbehandelter Früchte. Jede Sorte steht als unabhängige Versuchswiederholung. Hanita (1: n = 66 / 62, 2: n = 90 / 88), Hauszwetschge (n = 90) und Katinka (n = 90). Genaue Zahlen zur statistischen Auswertung sind im Anhang zu finden.

So sind die Werte für die Festigkeit der Sorte Hanita etwas geringer als für die Sorten Hauszwetschge und Katinka. Jedoch konnte bei keiner der dargestellten Sorten nach der Plasmabehandlung Unterschiede in der Festigkeit zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine Plasmabehandlung von 2,5 Minuten keine Auswirkungen auf die Fruchtfleischfestigkeit von Zwetschgen hat.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Festigkeitsbestimmung aus dem Kontrollversuch mit verschiedenen Varianten dargestellt. Untersucht werden sollte mit diesem Versuch, ob die Temperatur der verwendeten Früchte oder die einseitige Behandlung eine Auswirkung auf das Versuchsergebnis hat.

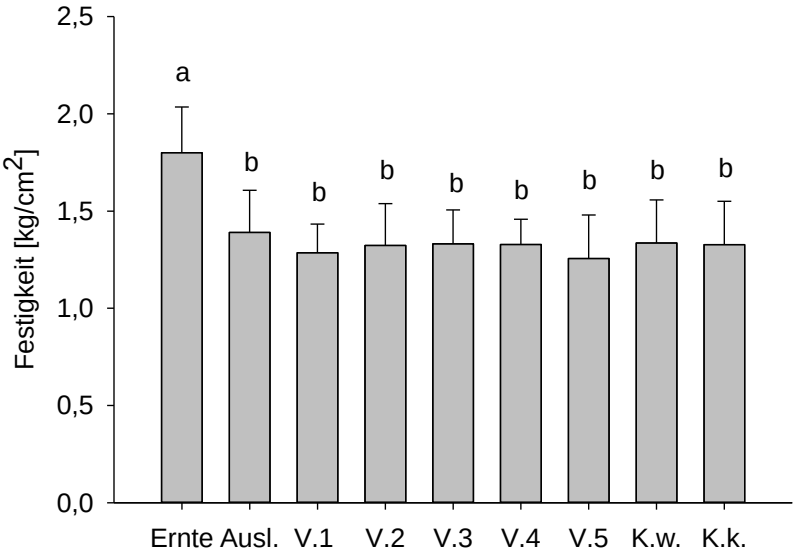

Abbildung 29. Fruchtfleisch-festigkeit der Varianten aus dem Kontrollversuch.

V.1: Variante 1, V.2: Variante 2, V.3: Variante 3, V.4: Variante 4, V.5: Variante 5, K.w.: Kontrolle warm, K.k.: Kontrolle kalt. n = 21 Einzelwerte aus einer Versuchs-wiederholung. Eine detaillierte statistische Auswertung ist im Anhang aufgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten hat ergeben, dass die Festigkeit der einzelnen Varianten nicht signifikant verschieden ist. Ob die Früchte einseitig oder beidseitig behandelt werden und ob die Ausgangstemperatur kalt oder warm ist, verändert demnach nicht den Plasmaeffekt auf die Fruchtfleischfestigkeit.

3.5.3 Säuregehalt

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

In Abbildung 30 ist der Säuregehalt der untersuchten Sorten dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass sich die verschiedenen Sorten im Säuregehalt deutlich unterscheiden. So ist in den Sorten Hauszwetschge und Katinka deutlich weniger Säure enthalten als in der Sorte Hanita. Zwischen den plasmabehandelten Varianten und den Kontrollfrüchten besteht jedoch nach statistischer Auswertung kein signifikanter Unterschied. Die geprüfte Plasmabehandlung hat demnach keinen Einfluss auf den Säuregehalt in Zwetschgen.

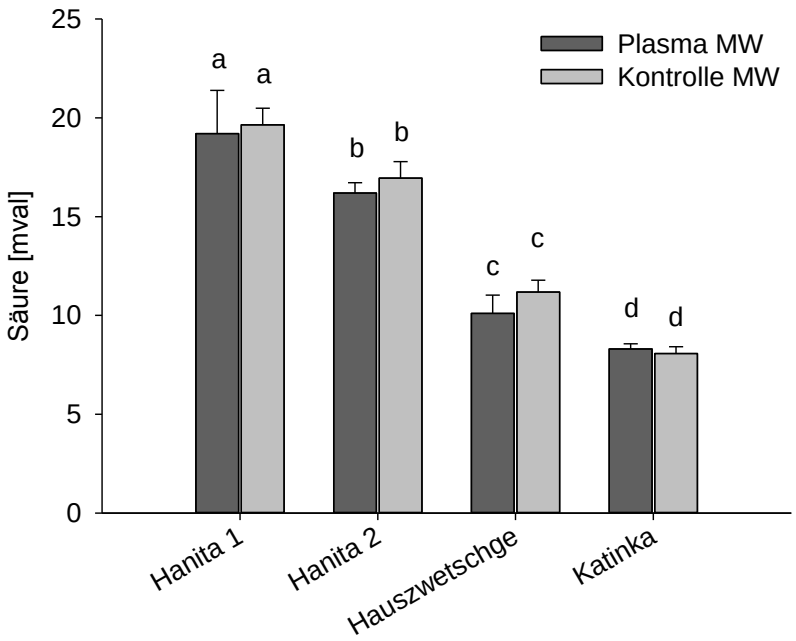

Abbildung 30. Säuregehalt der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Verglichen wurden Werte plasmabehandelter Früchte mit Werten unbehandelter Früchte. Jede Sorte steht als unabhängige Versuchswiederholung. Hanita (1: n = 6, 2: n = 6), Hauszwetschge (n = 6) und Katinka (n = 3). Die detaillierte statistische Auswertung findet sich im Anhang.

Abbildung 31 zeigt den Säuregehalt und die buchstabenbasierte Darstellung der statistischen Auswertung der verschiedenen Varianten aus dem Kontrollversuch.

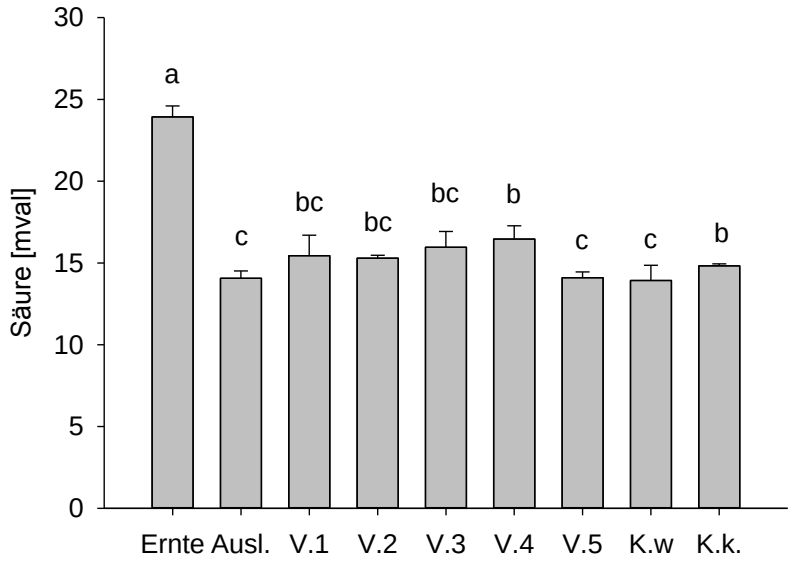

Abbildung 31. Säuregehalt der Varianten aus dem Kontrollversuch.

V.1: Variante 1, V.2: Variante 2, V.3: Variante 3, V.4: Variante 4, V.5: Variante 5, K.w.: Kontrolle warm, K.k.: Kontrolle kalt. n = 3 Einzelwerte aus einer Versuchswiederholung. Eine detaillierte statistische Auswertung ist im Anhang aufgelistet.

Demnach gibt es keinen Unterschied im Säuregehalt zwischen den Varianten 1, 2, 3 und 4. Diese Varianten unterscheiden sich auch nicht von den kalt behandelten Kontrollfrüchten. Jedoch besteht nach Statistik ein Unterschied zwischen Variante 4 (zweiseitige Behandlung, jeweils 2,5 Minuten) und Variante 5 (einseitige Behandlung, 5 Minuten) sowie zwischen Variante 4 und der warmen Kontrolle. Allerdings liegt das Signifikanzniveau nach Tukey-HSD in beiden Fällen über dem Wert 0,01. Der Unterschied zwischen den jeweiligen Varianten ist demnach lediglich signifikant und nicht hoch oder höchst signifikant. Zudem wurden sowohl Variante 4 als auch Variante 5 insgesamt 5 Minuten mit Plasma behandelt und die Ausgangstemperatur der Früchte in Variante 4 war in etwa gleich der Ausgangstemperatur der warmen Kontrollfrüchte. Aus diesen Gründen wird davon ausgegangen, dass der ermittelte Unterschied im Säuregehalt der verschiedenen Varianten auf einem Zufall beruht und die unterschiedlichen Ausgangssituationen für die Plasmabehandlung deren Effekt nicht nennenswert beeinflussen.

3.5.4 Zuckergehalt

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

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse für die Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka dargestellt.

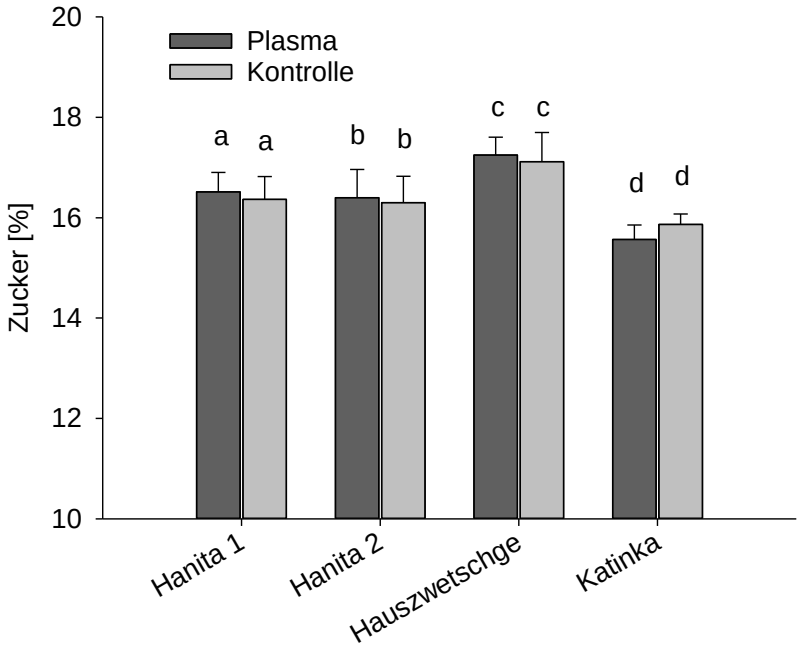

Abbildung 32. Zuckergehalt der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Verglichen wurden Werte plasmabehandelter Früchte mit den Werten unbehandelter Früchte. Jede Sorte steht als unabhängige Versuchswiederholung. Hanita (1: n = 6, 2: n = 6), Hauszwetschge (n = 6) und Katinka (n = 3). Eine detaillierte statistische Auswertung findet sich im Anhang.

Insgesamt unterscheidet sich der Zuckergehalt der verschiedenen Sorten nicht wesentlich und liegt etwa zwischen 16 % und 18 %. Auch zwischen den Varianten plasmabehandelt und unbehandelte Kontrolle besteht nach statistischer Auswertung kein signifikanter Unterschied. Auf den Zuckergehalt von Zwetschgen hat eine Plasmabehandlung von 2,5 Minuten demnach keinen Effekt.

In Abbildung 33 sind die Werte des Zuckergehalts und die Ergebnisse der statistischen Auswertung für die unterschiedlichen Kontrollvarianten dargestellt.

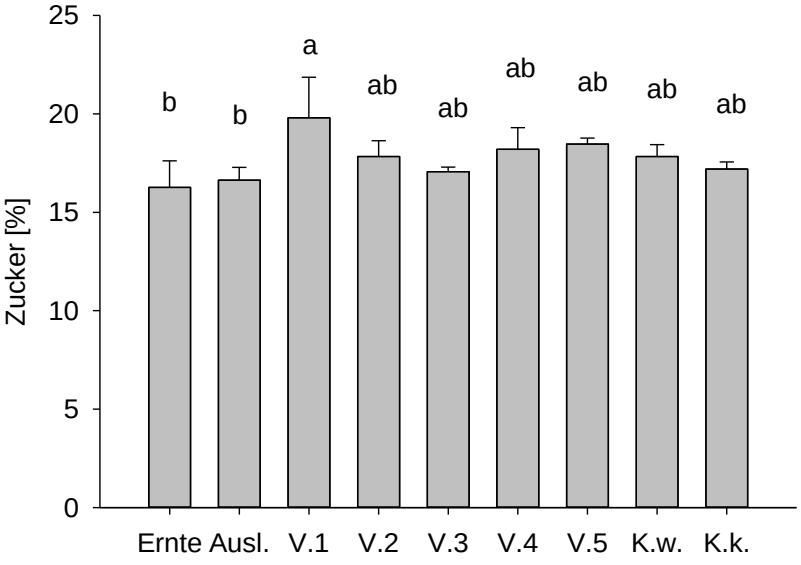

Abbildung 33. Zuckergehalt der Varianten aus dem Kontrollversuch.

V.1: Variante 1, V.2: Variante 2, V.3: Variante 3, V.4: Variante 4, V.5: Variante 5, K.w.: Kontrolle warm, K.k.: Kontrolle kalt. N = 3 Einzelwerte aus einer Versuchswiederholung. Eine detaillierte statistische Auswertung findet sich im Anhang.

Wie die Darstellung der statistischen Auswertung zeigt, bestehen statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem Zuckergehalt der Früchte zum Erntezeitpunkt und Früchten der Variante 1 (kalte Früchte 2,5 Minuten plasmabehandelt) sowie zwischen Früchten zum

Zeitpunkt der Auslagerung und Früchten Variante 1. Da allerdings zu den anderen Varianten jeweils kein signifikanter Unterschied besteht, wird auch in diesem Fall von einem durch natürliche Schwankungen hervorgerufenen Unterschied im Zuckergehalt ausgegangen.
Demnach kann gesagt werden, dass der fehlende Einfluss der Plasmabehandlung von 2,5 Minuten auf den in Abbildung 32 dargestellten Zuckergehalt nicht auf der einseitigen Behandlung, der Behandlungsdauer oder der Ausgangstemperatur der Früchte beruht.

3.5.5 Vitamin C-Gehalt

Da Zwetschgen vor allem wegen ihres Vitamin C-Gehalts eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen wird, ist dieser ein wichtiges Qualitätskriterium. Eine Plasmabehandlung sollte deshalb keine negativen Auswirkungen auf den Gehalt an Vitamin C der Zwetschgen haben. Aus diesem Grund wurde mittels HPLC die Vitamin C-Konzentration im Fruchtfleisch der Sorten Hanita und Hauszwetschge nach einer Plasmabehandlung gemessen und mit der Konzentration in unbehandelten Kontrollfrüchten verglichen. Die Vitamin C-Konzentration wurde in mg / 100 g Frischgewicht angegeben.
Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 34 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in Früchten der Sorte Hauszwetschge der Vitamin C-Gehalt mit etwa 1 mg /100 g Frischgewicht etwas geringer ist als in Früchten der Sorte Hanita mit etwa 1,5 - 2,0 mg / 100 g Frischgewicht. Die statistische Auswertung der Varianten einer Sorte ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede.

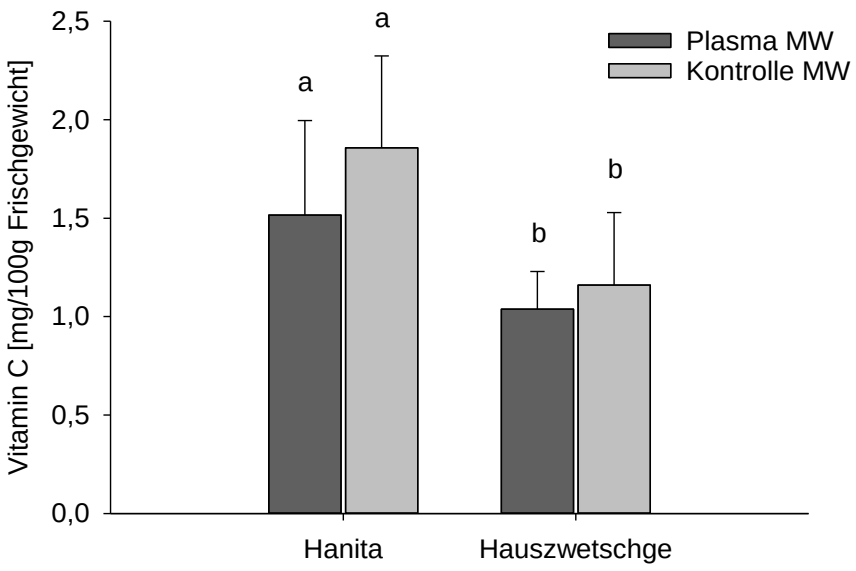

Abbildung 34. Vitamin C-Konzentration der Sorten Hanita und Hauszwetschge.

In mg / 100 g Frischgewicht nach 2,5 Minuten Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Hanita (n = 9 bzw. 6), Hauszwetschge (n = 6). Details zur statistischen Auswertung finden sich im Anhang.

Aufgrund dessen wird davon ausgegangen, dass die Plasmabehandlung bei 2,5 Minuten Behandlungsdauer keine signifikanten Effekte auf den Vitamin C-Gehalt hat. Betrachtet man jedoch die Balken ohne Standardabweichung und statistische Kennzeichnung, ist in beiden Sorten ein Trend hin zu einem geringeren Vitamin C-Gehalt in plasmabehandelten Früchten

zu erkennen. So liegt für die Sorte Hanita der Mittelwert der unbehandelten Kontrolle (1,86) 0,34 mg höher als der Mittelwert der plasmabehandelten Variante (1,52). Für die Sorte Hauszwetschge liegt der Mittelwert der Kontrolle (1,16) um 0,12 mg höher als der Mittelwert der plasmabehandelten Früchte (1,04). Erfahrungsgemäß sind jedoch Unterschiede unter 1 mg durchaus natürlich und beruhen deshalb in diesem Fall nicht auf einer Wirkung des Plasmas (mündliche Absprache mit Dr. Daniel Neuwald aus dem Arbeitsbereich Ernte, Lagerung und Fruchtqualität des KOB).

3.5.6 Polyphenolgehalt

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

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

Abbildung 35 zeigt die Konzentration der in den analysierten Proben nachgewiesenen Hydroxyzimtsäuren in mg / g Trockensubstanz (TS). Gegenübergestellt sind dabei für jede Verbindung die plasmabehandelte Variante und die unbehandelte Kontrolle. Die Buchstaben zeigen die Ergebnisse der statistischen Auswertung.

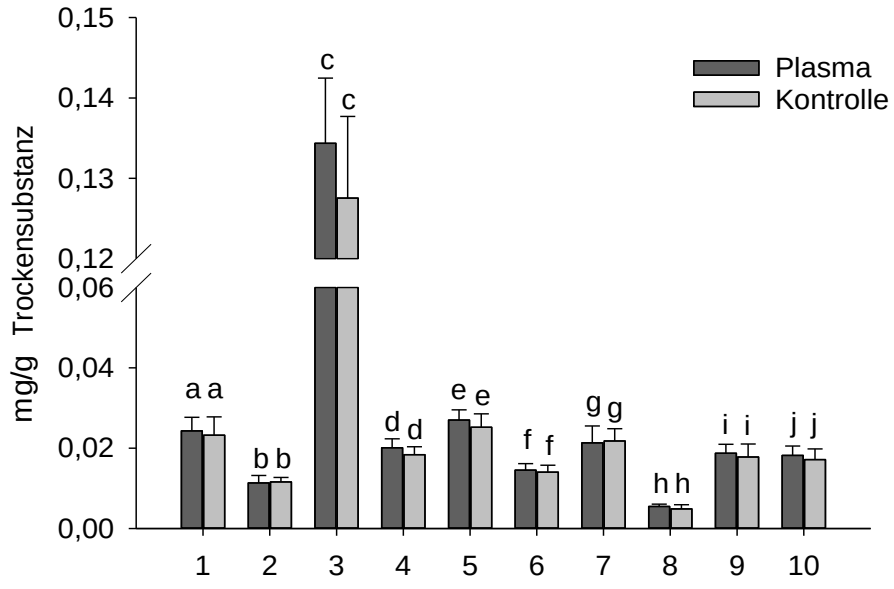

Abbildung 35. Gehalt an Hydroxyzimtsäuren 1-10.

In der folgenden Reihenfolge: HCA1, HCA2, HCA3, HCA4, HCA5, HCA6, HCA7, HCA8, HCA8.1, HCA9. Jeweils n = 9. Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen. Zahlen zur detaillierten statistischen Auswertung sind im Anhang aufgelistet.

Es ist zu erkennen, dass der Gehalt der einzelnen HCAs relativ unterschiedlich sein kann. So sind beispielsweise von HCA3 in etwa 0,13 mg / g TS enthalten, während von den anderen HCAs mit Werten zwischen 0,01 und 0,03 mg / g TS deutlich weniger enthalten ist. Im Gegensatz dazu hat der statistische Vergleich der plasmabehandelten und unbehandelten Varianten keinen Unterschied in der Konzentration der einzelnen HCAs ergeben. Eine Plasmabehandlung von 2,5 Minuten hat demnach auf die hier dargestellten phenolischen Verbindungen keinen Einfluss.

In Abbildung 36 ist die Konzentration an spezifischen Hydroxyzimtsäuren, Flavonoiden, Flavonen und Flavonolen in den analysierten Proben in mg / g TS dargestellt.

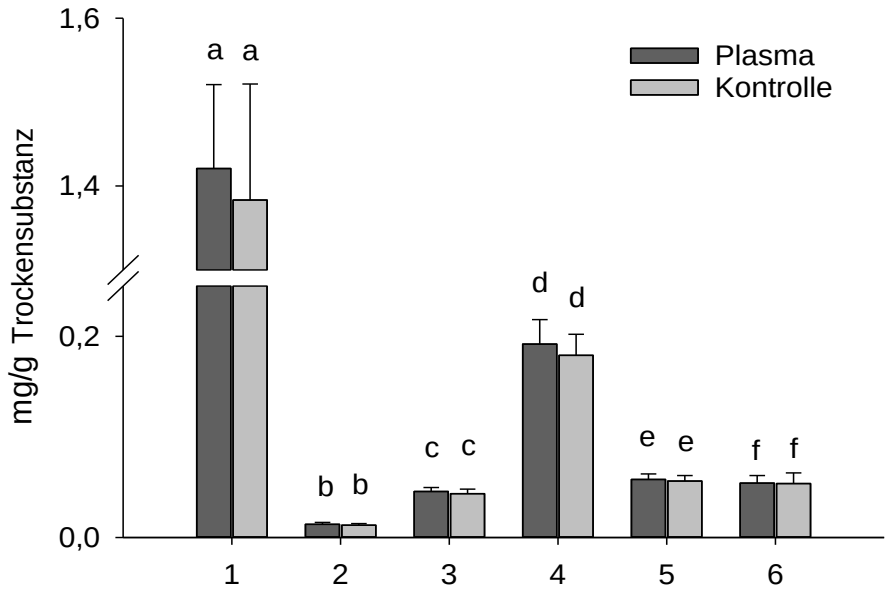

Abbildung 36. Gehalt an Hydroxyzimtsäuren, Flavonen und Flavonolen 1-6.

In der folgenden Reihenfolge: 1: Neochlorogensäure, 2: 3-p-Cumaroaylchinasäure, 3: Feruloylchinasäure, 4: n-Chlorogensäure, 5: Flavon, 6: Flavonol. Jeweils n = 9 Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen. Details zur Statistik finden sich im Anhang.

Auch hier sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Während von 3-p-Cumaroaylchinasäure, Feruloylchinasäure, Flavon und Flavonol weniger als 0,1 mg / g TS enthalten sind, konnten von n-Chlorogensäure etwa 0,2 mg / g TS und von Neochlorogensäure etwa 1,5 mg / g TS detektiert werden. Die 2,5-minütige Plasmabehandlung hatte jedoch auch hier im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration der dargestellten phenolischen Verbindungen.

Neben den gezeigten hauptsächlich in Zwetschgen vorkommenden HCAs konnten in den analysierten Proben auch 3 nicht näher charakterisierte phenolische Verbindungen nachgewiesen werden. Diese sind in Abbildung 37 als unbekannte phenolische Verbindungen 1, 2 und 3 bezeichnet dargestellt.

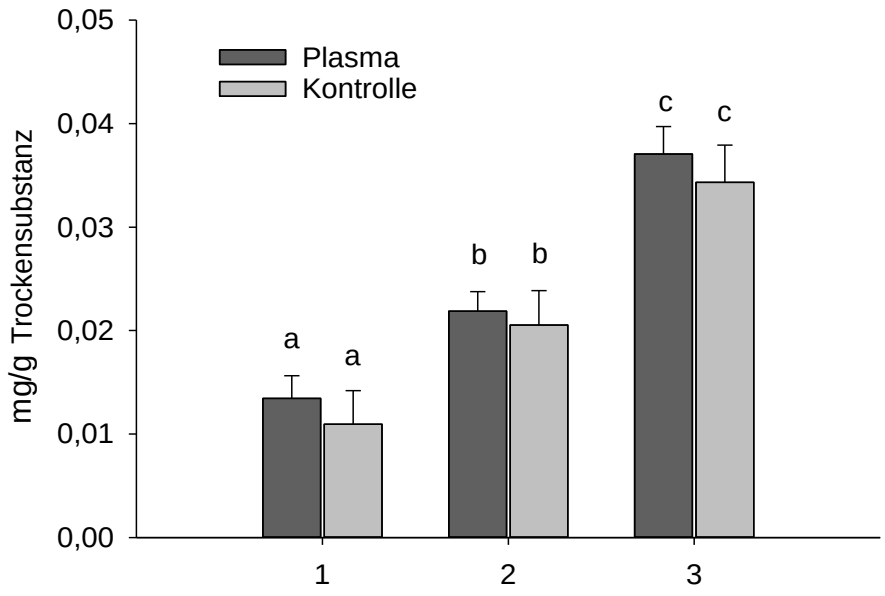

Abbildung 37. Gehalt unbekannter phenolischer Verbindungen Nr. 1, 2, 3.

Mit jeweils n = 9 Einzelwerten aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen. Details zu den statistischen Auswertungen finden sich im Anhang.

Auch diese Verbindungen unterscheiden sich in ihrem Gehalt deutlich voneinander, sind aber insgesamt in deutlich geringeren Konzentrationen enthalten als die in den vorangegangenen Abbildungen dargestellten HCAs, Flavonen und Flavonolen. Die statistische Auswertung der Daten hat auch hier ergeben, dass die beschriebene Plasmabehandlung keinen signifikanten Effekt auf den Gehalt der Substanzen hat, wenn sie mit unbehandelten Kontrollvarianten verglichen wird.

In Abbildung 38 ist der Gehalt an Anthocyanen in den untersuchten Fruchtproben dargestellt. Auch hier sind wiederum für jede Substanz die plasmabehandelte Variante und die unbehandelte Kontrolle gegenübergestellt. Die buchstabenbasierte Darstellung zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung.

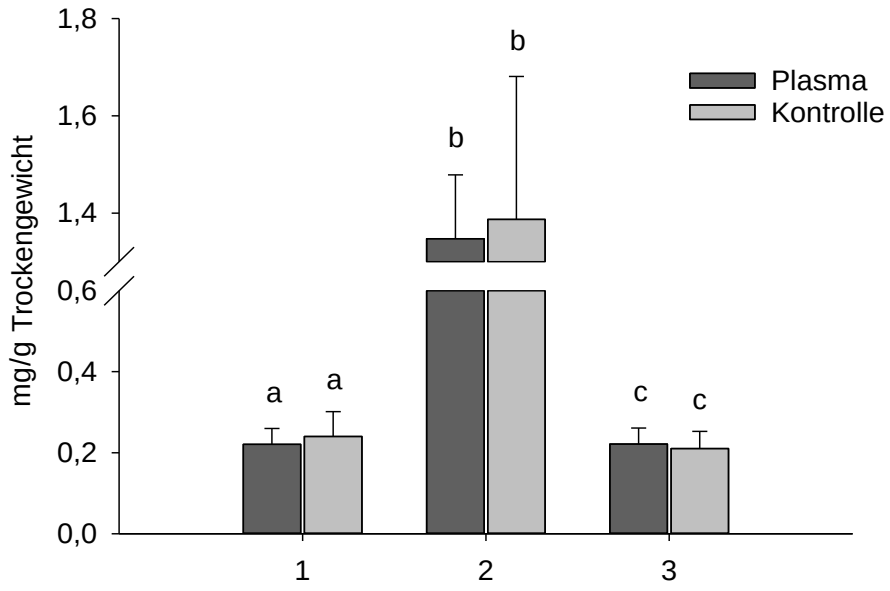

Abbildung 38. Gehalt an Anthocyanen 1 - 3.

In der folgenden Reihenfolge: Cyanidin 3-Glukosid, Cyanidin 3-Rutinosid, Päonidin 3-Rutinosid. N = 9 Einzelwerte aus 3 unabhängigen Versuchswiederholungen. Details zur statistischen Auswertung finden sich im Anhang.

Insgesamt betrachtet unterscheiden sich auch die Anthocyane in ihrer Konzentration recht deutlich. Während von Cyanidin 3-Glukosid und Päonidin 3-Rutinosid Werte zwischen 0,2 und 0,3 mg / g TS berechnet wurden, ist von der Verbindung Cyanidin 3-Rutinosid mit etwa 1,4 mg / g TS etwa 5- bis 7-mal so viel enthalten. Die statistische Auswertung der Daten ergab jedoch auch für die nachgewiesenen Anthocyane keine signifikanten Unterschiede zwischen plasmabehandelter und unbehandelter Variante.

3.6 Untersuchungen zu den Wirkmechanismen des Plasmas

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

In Abbildung 39 sind die KbE der untersuchten Varianten aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen dargestellt. Sowohl durch eine Behandlung mit UV-Strahlung als auch durch die Behandlung mit dem gesamten Plasma ergaben sich signifikant unterschiedliche Zahlen von KbE auf den Platten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Median = 141 KbE). Jedoch unterscheiden sich auch die Zahlen von UV-Behandlung und Plasmabehandlung signifikant voneinander. So liegt der Median der UV-behandelten Variante bei 71 KbE und der Median der plasmabehandelten Variante bei 2,5 KbE.

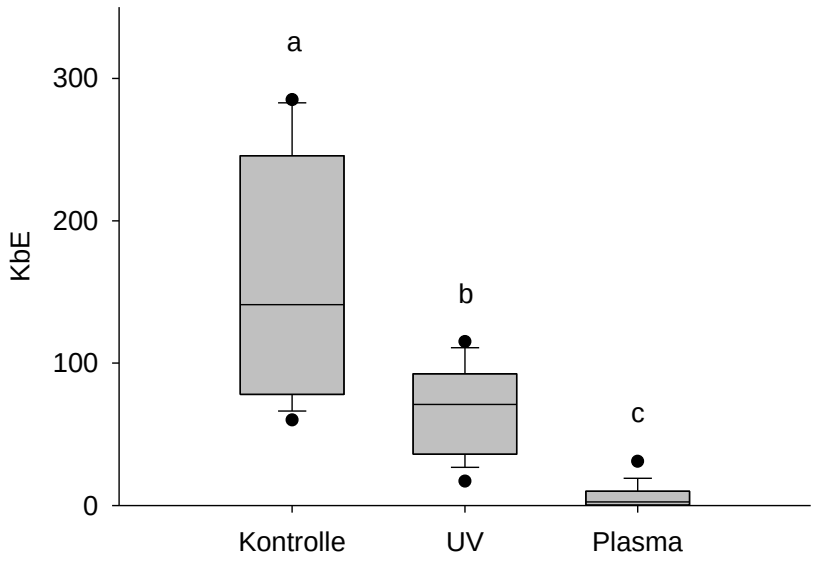

Abbildung 39. Effekt der Wirkmechanismen des Plasmas auf Myzel von *M. laxa*.

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

Anhand dieser Resultate kann davon ausgegangen werden, dass durch die synergistische Wirkung von Radikalen und UV-Strahlung ein dekontaminierender, sterilisierender Effekt von Plasma im Vergleich zu reiner UV-Strahlung wesentlich verbessert wird.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

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

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

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

Eine künstliche Inokulation von Zwetschgen konnte nur mit oberflächlich verletzten Früchten erreicht werden. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit Sporensuspension erreicht. Eine Vorinkubation der Sporen in Zuckerlösung brachte keine Verbesserung der Inokulationsrate. Es wurde festgestellt, dass ab einer Oberflächentemperatur von 36 °C die Beduftung der

Zwetschgen optisch sichtbar zu schmelzen beginnt. Um dies zu verhindern, wurden für die Plasmabehandlungen nur gekühlte Zwetschgen eingesetzt. Eine Infektion der Früchte konnte jedoch durch die Plasmabehandlung nicht verringert oder verhindert werden.

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

Dass die Wirkung des Plasmas auf einer Synergie aus UV-Strahlung und Radikalen beruht, konnte durch den Vergleich verschieden behandelter Varianten von Myzelsuspensionen gezeigt werden. So konnte zwar bereits durch die UV-Strahlung eine signifikante Abtötung der Hyphen erreicht werden, der Wirkungsgrad einer Behandlung mit dem vollständigen Plasma war jedoch signifikant höher als bei einer Behandlung mit dem UV-Bestandteil des Plasmas durch Abschirmen der Radikale mithilfe eines MgF_2 Plättchens.

4. Diskussion

Plasma wird in industriellen Prozessen bereits vielseitig eingesetzt (Janzen, 1992; Leins *et al.*, 2012). Durch seine physikalischen Eigenschaften und das Zusammenwirken verschiedener Mechanismen sind auch seine dekontaminierenden Eigenschaften interessant (Ehlbeck *et al.*, 2011; Weltmann *et al.*, 2012). Für Sterilisationsprozesse in der Medizin wird es seit einigen Jahren erfolgreich genutzt (Ehlbeck *et al.*, 2011). Auch im Bereich der Lebensmittelhygiene und -sicherheit wird der Einsatz von Plasma gegen humanpathogene Keime seit einigen Jahren umfangreich erforscht (Niemiera und Sites, 2008; Fröhling *et al.*, 2012b; Misra *et al.*, 2014; Surowsky *et al.*, 2014b). Neu ist nun die Idee, Plasma als Pflanzenschutzmittel in der Nachernte gegen phytopathogene Pilze einzusetzen. Aufgrund der strengen Richtlinien des Lebensmitteleinzelhandels für Rückstände von Pflanzenschutzmitteln sind Nacherntebehandlungen von Obst und Gemüse in Europa nicht gestattet (Kittemann *et al.*, 2008). Da es sich bei einer Plasmabehandlung um eine physikalische Anwendung handelt, kann bei dieser Methode davon ausgegangen werden, dass keine Rückstände auf den Lebensmitteln verbleiben (SKLM, 2012). Eine Anwendung wäre hier deshalb grundsätzlich denkbar.

Für die Überprüfung einer möglichen Anwendbarkeit von Plasma gegen phytopathogene Pilze auf landwirtschaftlichen Produkten erschien der Fruchtfäuleerreger *Monilinia spp.* mit der Zwetschge als Wirtspflanze als ein geeignetes Modell. Sowohl in den USA als auch in Europa hat der Zwetschgenanbau einen wichtigen Anteil am Obstbau (Michailides *et al.*, 2007; Okie und Hancock, 2008; Winter und Link, 2002). Gleichzeitig führen Infektionen der Zwetschgen mit *Monilinia spp.* auf beiden Kontinenten in der Nachernte zu bedeutenden Ausfällen (Michailides *et al.*, 2007; Fritsch, 2009a). Ein weiterer Grund für die Wahl dieses Modells ist der regionale Bezug Baden-Württembergs zur Zwetschge. Das Bundesland ist das größte Anbaugebiet für Zwetschgen in Deutschland (Fritsch und Hinrichs-Berger, 2011b). Zudem sind Zwetschgen durch ihr festes Fruchtfleisch und ihre stabile Schale im Vergleich zu anderen Obstsorten, wie beispielsweise Erdbeeren, relativ unempfindlich und dadurch einfach zu handhaben.

Um zu überprüfen, ob eine Plasmabehandlung wirksam gegen *Monilinia*-Infektionen auf Zwetschgen eingesetzt werden kann, wurden Myzel und Sporen des Pilzes auf Modellsubstraten mit dem effluenten Plasmagas eines Mikrowellen-Plasmabrenners bei Atmosphärendruck behandelt. Als Arbeitsgas für den Brenner wurde dabei Luft eingesetzt.

Für eine gleichmäßige Wirkung des Plasmas über den Behandlungszeitraum hinweg ist es wichtig, dass sich die Plasmazusammensetzung und -qualität nicht verändert. Gewährleistet wurde dies zum einen durch eine Absauganlage, welche das ausgestoßene und am Substrat vorbeiströmende Plasmagas aus der Raumluft entfernt. Zum anderen wurde durch die

tangentiale Zufuhr des Arbeitsgases Luft und die ständige Kühlung des Resonators ein stabiler Betrieb gesichert (Leins *et al.*, 2012; Leins *et al.*, 2015).

Nach der Plasmabehandlung wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KbE) auf Agarplatten gezählt und mit den KbE der unbehandelten Variante verglichen. Außerdem wurden mit *Monilinia* inokulierte Früchte behandelt, um die Wirkung auf dem natürlichen Substrat zu überprüfen. Damit ein negativer Einfluss auf die Fruchtqualität ausgeschlossen werden konnte, wurden nach Plasmabehandlungen verschiedene Fruchtqualitätsparameter analysiert. Das Ziel war dabei, durch die Plasmabehandlung eine signifikante Reduktion des Myzelwachstums und der Sporenkeimung sowohl auf den Modellsubstraten als auch auf der Frucht zu erreichen. Außerdem sollte gezeigt werden, dass die Plasmabehandlung keine negativen Auswirkungen auf wichtige Fruchtqualitätsparameter hat. Was die Wirkmechanismen der Plasmabehandlung betrifft wurde davon ausgegangen, dass der abtötende Effekt auf einer Synergie aus den im Plasma vorkommenden Radikalen und der UV-Strahlung beruht und dieses Zusammenwirken für ein zuverlässiges Ergebnis entscheidend ist.

4.1 Wirkmechanismen im Plasma

Die Wirkmechanismen im Plasma ergeben sich aus einer Synergie von UV-Strahlung, Radikalen, Atomen und Molekülen (Weltmann *et al.*, 2012). Allerdings gilt dies laut Moisan *et al.* (2002) vor allem für Plasmaerzeugung unter Niederdruck (<10 torr). Hier wurde vermutet, dass bei Atmosphärendruck ein Großteil der Strahlung vom umgebenden Gas/Raumluft absorbiert wird und die Mechanismen deshalb bei Atmosphärendruck anders verlaufen müssten. Es wurde aber auch festgestellt, dass die Mechanismen bei diesen Bedingungen noch nicht vollkommen untersucht und verstanden sind. Die Versuche der vorliegenden Arbeit mit *Monilinia spp.* auf Agarplatten haben gezeigt, dass die Abtötungsrate wie bei Niederdruckverfahren beschrieben, in drei Phasen verläuft. Zudem haben die in Kapitel 2.11 beschriebenen Kontrollversuche mit MgF_2 Plättchen zur Abschirmung der Radikale gezeigt, dass auch mit dem hier eingesetzten Atmosphärendruckplasma ein Zusammenwirken der einzelnen Plasmabestandteile die gute Wirkung erzeugt. Welche Art von Molekülen und Radikalen jedoch effektiv beim Substrat ankommt, kann anhand der hier gewonnenen Ergebnisse nicht gesagt werden. Bei einer indirekten Plasmabehandlung mit Afterglow kann zum einen vermutet werden, dass vor allem langlebige Teilchen wie Ozon und Stickoxide das Substrat erreichen. Zum anderen ist es aber auch möglich, dass die Plasmabestandteile auf dem Weg zum Substrat mit Luftmolekülen reagieren und so die Bildung von Sauerstoffradikalen bewirken. Um die Bestandteile, welche das Substrat tatsächlich erreichen, zu detektieren, kann das Plasmagas mithilfe optischer Emissionsspektroskopie analysiert werden. Diese Methode ist die am häufigsten eingesetzte Diagnostik in der Plasmaphysik (Surowsky *et al.*, 2014a). Das von Ionen, Atomen und Molekülen emittierte

Licht wird damit als eine Funktion aus Wellenlänge, Zeit und Ort dargestellt und erlaubt so eine genauere Diagnostik der Plasmazusammensetzung (Surowsky *et al.*, 2014a).
Durch den Einsatz von MgF_2 Filtern während Plasmabehandlungen von *Monilinia*-Myzel konnten die im Plasmagas enthaltenen Radikale, Atome und Moleküle abgeschirmt werden. Für Strahlung mit Wellenlängen bis in den sichtbaren Bereich sind diese Filter jedoch durchlässig. Das Ziel dieses Versuches war es, die Bedeutung des Zusammenwirkens der einzelnen Plasmakomponenten für eine zuverlässige und verhältnismäßig schnelle Wirkung zu verdeutlichen. Die so behandelten Proben wurden mit den unbehandelten Kontrollen sowie mit herkömmlich mit Plasma behandelten Proben verglichen. Dabei wurde die Theorie zum Zusammenwirken der Plasmabestandteile bestätigt. Die Anzahl KbE war bei mit Plasma behandelten Proben deutlich geringer als bei mit UV-Strahlung behandelten Proben. Die zuverlässige Abtötung des *Monilinia*-Myzels ist demnach von der Wirkung beider Plasmakomponenten abhängig. Nicht genauer spezifiziert wurde mit diesen Versuchen, welche Art von Radikalen bei dieser indirekten Behandlung mit einem Luftplasma tatsächlich beim Substrat ankommen.
Da Plasma eine oberflächlich wirkende Technik ist und eine verhältnismäßig geringe Eindringtiefe besitzt, hat die Beschaffenheit von Substratoberflächen und die darauf vorliegende mikrobielle Dichte einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit einer Behandlung (Surowsky *et al.*, 2014a). Die Plasmabestandteile können durch unregelmäßige Bereiche auf der Oberfläche abgeschirmt werden, wodurch die Mikroorganismen an diesen Stellen nicht erreicht werden (Critzer *et al.*, 2007). Bei pflanzlichen Substraten sind dies beispielsweise die Schließzellen der Stomata oder die Nüsschen bei Erdbeeren (Fernandez *et al.*, 2013). Auch die kristallinen Wachsschichten der Epidermis könnten eine abschirmende Wirkung haben. Je nach Oberflächenstruktur sind verschiedene Obst- und Gemüsearten demnach unterschiedlich erfolgreich mit Plasma zu behandeln. Als besonders schwierig sind die genannten Erdbeeren und Salat beschrieben (Surowsky *et al.*, 2014a). Zwetschgen besitzen im Vergleich dazu auf den ersten Blick eine verhältnismäßig regelmäßige Oberfläche. Durch die je nach Sorte unterschiedlich stark ausgebildete Wachsschicht auf der Kutikula sowie durch die Schließzellen der Stomata bestehen jedoch bedeutende Unregelmäßigkeiten. Sichtbar gemacht wurden diese beispielsweise durch Storey und Price (1999) mithilfe von Rasterelektronenmikroskopie. Bei Biofilm bildenden oder in einer großen Dichte vorkommenden Mikroorganismen ist der Behandlungserfolg ebenfalls nicht gesichert (Surowsky *et al.*, 2014a). In diese Gruppe kann *Monilinia spp.* jedoch nicht eingeordnet werden. Ihre Konidien liegen beispielsweise bei Pfirsichen mit einer durchschnittlichen Anzahl von 10^3-10^5 pro Frucht vor (Phillips, 1971; Gell *et al.*, 2008). Relativ zur Größe der Fruchtoberfläche dürften die Zahlen demnach bei Zwetschgen bei etwa 10^2-10^3 liegen. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl Sporen pro Frucht

damit zwar sehr hoch sein kann, ihre Dichte jedoch relativ gering bleibt und die Sporen in der Regel vereinzelt vorliegen. Problematischer für die Wirksamkeit einer Plasmabehandlung sind bei Zwetschgen latent vorkommende Infektionen, die die Barriere der Epidermis unter Umständen bereits überwunden haben und deshalb vom Plasma nicht mehr erreicht werden können (Jenkins und Reinganum, 1965; Gell *et al.*, 2008; Surowsky *et al.*, 2014a).

4.2 Möglicher Wärmeeffekt durch die Plasmabehandlung

Da das austretende Plasma noch eine Gastemperatur von über 1000 °C besitzt, die jedoch durch Angleichung an das umgebende Gas schnell unter 100 °C sinkt (siehe Kapitel 2.9), wurden die Behandlungen indirekt mit dem effluenten Plasmagas durchgeführt. Dennoch wurde währenddessen eine Erwärmung der Substrate beobachtet. So erreichten nach 10 Minuten Agarplatten eine Temperatur von 38,3 °C, PET-Folien erhitzten ohne Alkohol als Kühlmittel in kurzer Zeit auf über 80 °C. Um eine zu schnelle Erwärmung von Zwetschgen während einer Behandlung zu vermeiden, mussten gekühlte Früchte eingesetzt werden, welche nach 8 Minuten eine Oberflächentemperatur von 36 °C erreichten. Es wurde beobachtet, dass dieser Wert den kritischen Punkt darstellt, an welchem die Wachsschicht der Zwetschgenhaut für das bloße Auge sichtbar zu schmelzen beginnt.

Um auszuschließen, dass durch die Erwärmung des Agars auf 38,3 °C während einer Plasmabehandlung deren Effekt auf den behandelten Organismus beeinflusst wird, wurde Myzel von *M. laxa* auf PDA für je 10 Minuten verschiedenen Temperaturen bis zu einem Maximum von 50 °C ausgesetzt und das Wachstum über die Bestimmung des Myzeldurchmessers beobachtet. Dabei konnte kein Wärmeeffekt beobachtet werden. In Publikationen zu Wärmebehandlungen gegen die Keimung von Sporen von *Monilinia spp.* und *Botrytis cinerea* liegen die Parameter für einen inhibierenden Effekt bei einem Minimum von 40 °C und 10 Minuten Behandlungszeit (Liu *et al.*, 2012). Dabei wurde das Auskeimen von *Monilinia fructigena* Sporen lediglich verzögert und es wurde trotz Wärmebehandlung eine Keimrate von 95 % erreicht. Ähnlich beschreiben Marquenie *et al.* (2002), dass eine Wärmebehandlung von *B. cinerea* Sporen bei 39 °C nicht ausreichend ist, um ein Keimen der Sporen zu verhindern. Da während der maximal 10-minütigen Plasmabehandlungen die Temperatur der Substratoberfläche nicht über 38,3 °C anstieg, kann anhand dieser Angaben davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse aus den Versuchen zum Wärmeeffekt verlässlich sind und die abtötende Wirkung der Behandlung vorrangig auf einen Plasmaeffekt zurückzuführen ist. Gleichzeitig wurde in den beschriebenen Publikationen jedoch eine synergistische Wirkung von einer parallel zu einer Behandlung mit UV-C verlaufenden Wärmebehandlung beschrieben (Marquenie *et al.*, 2002). Demnach kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die Wärme des Plasmas die Wirkung der Plasmabestandteile verstärkt. Soll die Plasmabehandlung langfristig kalt erfolgen, um das Substrat zu schonen

und Energie einzusparen, sollte mit einem verringerten Wirkungsgrad durch die fehlende Wärme gerechnet werden.

4.3 Plasmabehandlung von Myzel

Um einen ersten Eindruck zur Wirksamkeit einer Plasmabehandlung gegen Myzel von *Monilinia laxa* zu bekommen, wurden Tropfen von Myzelsuspension zunächst 5 Minuten mit Plasma behandelt und die Wirkung über die Bestimmung des Myzeldurchmessers im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle überprüft. Für die Feststellung eines möglichen Einflusses der Inokulumdichte wurden dabei verschiedene Verdünnungen der Myzelsuspension verwendet. Dieser Einfluss wurde durch den Vergleich der jeweiligen Differenz an Myzeldurchmesser zwischen den Varianten „plasmabehandelt“ und „Kontrolle“ ermittelt. Eine signifikante Reduktion des Myzeldurchmessers der plasmabehandelten Variante konnte damit gezeigt werden, ein Effekt der Inokulumdichte auf die Wirksamkeit der Plasmabehandlung war jedoch nicht erkennbar. Die Reduktion des Myzeldurchmessers durch die Plasmabehandlung war in allen Verdünnungsstufen in etwa gleich. Dabei besteht durchaus die Möglichkeit, dass die Dichte des Inokulums der hoch konzentrierten Myzelsuspensionen im Vergleich zu den Verdünnungen nicht ausreichend hoch waren, um eine Aussage über eine dichteabhängige Wirkung der Plasmabehandlung treffen zu können. Um dennoch zeigen zu können, dass die Plasmabehandlung ab einer gewissen Myzeldichte auf der Substratoberfläche nicht mehr ihre volle Wirksamkeit entfalten kann, weil darunter liegende Myzelschichten nicht mehr vom Plasma erreicht werden können, könnte beispielsweise eine Plasmabehandlung von Myzel in verschiedenen Wachstumsstadien durchgeführt werden.

Nach erfolgreichen Vorversuchen mit einer 5-minütigen Behandlungszeit mit Myzel wurden die Versuche mit verschiedenen Behandlungszeiten wiederholt, um eine optimale Dauer zu ermitteln. Dabei konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 5 Minuten eine signifikante Reduktion des Myzelwachstums von durchschnittlich 50 ± 24,58 % erreicht werden. Nach 10 Minuten wurde eine mittlere Reduktion von 92 ± 5,6 % erzielt. Für eine sichere Wirksamkeit der Plasmabehandlung und eine daraus resultierende verlängerte Haltbarkeit der Zwetschgen ist es wahrscheinlich, dass eine Reduktion von über 90 % des Inokulums auf der Fruchtoberfläche notwendig ist. Die dafür ermittelte Behandlungszeit von 10 Minuten ist jedoch für eine praktische Anwendung deutlich zu lang. Die Kosten für ein Kilogramm Zwetschgen würden sich dadurch um 24-25 Cent erhöhen[4], wodurch die Beliebtheit der Frucht beim Verbraucher und damit der Absatz der Ware sinken würden. Durch die Anpassung der Plasmaparameter zur Optimierung des Plasmagases oder durch den Einsatz einer kalten Plasmaquelle könnte die Dauer für die Plasmabehandlung weiter

[4]Berechnungsgrundlage siehe Abschnitt 4.7.

reduziert werden. Mit einem kalten Plasma könnte beispielsweise eine direkte Applikation stattfinden, da keine Nebeneffekte durch die Erwärmung des Substrates zu erwarten wären. Der Vorteil wäre eine direkte Wirkung der Mechanismen auf das Substrat. Eine weitere Möglichkeit zur Verkürzung der Behandlungsdauer ist das Hintereinanderschalten mehrerer kurzer Plasmabehandlungen während des Sortier- und Kommissionierungsprozesses. Aber auch hier müssen die Mehrkosten für den Verbraucher durch den Mehraufwand an Technik berücksichtigt werden.

Der Kurvenverlauf der Myzelbehandlung mit verschiedenen Behandlungszeiten in Abbildung 20 zeigt einen deutlichen sigmoidalen Verlauf. Die Abtötung der Hyphen verläuft demnach in drei Phasen mit jeweils unterschiedlichen Abtötungsgeschwindigkeiten. Die Phasen 1 und 3 zeigen dabei in etwa dieselbe Kinetik. Im Vergleich dazu zeigt Phase 2 eine deutlich erhöhte Abtötungsgeschwindigkeit. Diese Beobachtungen decken sich mit der Beschreibung der Kinetik einer Plasmabehandlung von *Bacillus subtilis* Sporen in einer Veröffentlichung von Moisan *et al.* (2002, Abbildung 40). Demnach lassen sich am Kurvenverlauf die Wirkmechanismen der Plasmabehandlung ablesen:

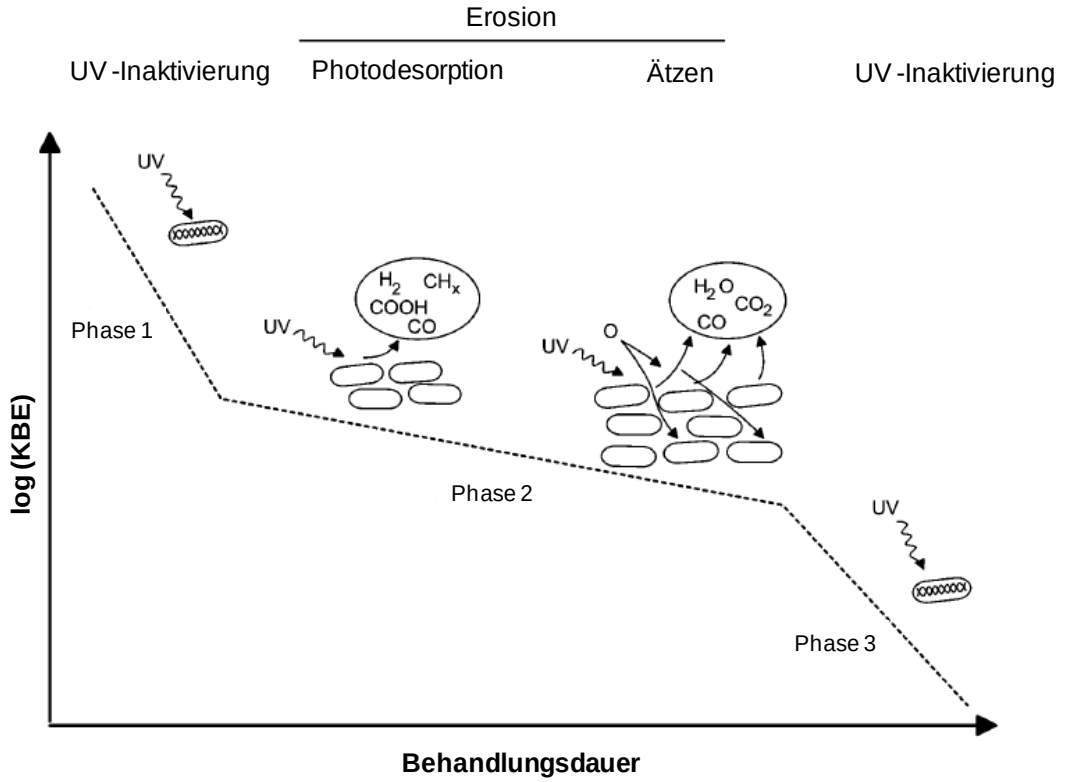

Abbildung 40. Schematische Darstellung einer Abtötungskinetik.

Die Abtötung verläuft logarithmisch in 3 Phasen. Dabei sind verschiedene Wirkmechanismen beteiligt. Erstellt wurde diese Grafik anhand von Beobachtungen mit *Bacillus subtilis* Sporen. Grafik modifiziert nach Moisan 2002.

Grundsätzlich wird die Abtötung der Sporen durch UV-Strahlung bewirkt, die die Sporenwand durchdringt und die DNA im Inneren der Zelle schädigt. Dieser Mechanismus verläuft jedoch in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Zellwand, der Lage der DNA in der Zelle und der

Dichte des Inokulums auf dem Substrat unterschiedlich. Hier wird davon ausgegangen, dass die Inaktivierung in Phase 1 durch die UV-Strahlung hervorgerufen wird. Phase 2 wird vor allem durch die Erosion der Zelloberfläche (Photodesorption und Ätzen) bestimmt. In Phase 3 werden die bis dahin verbliebenen aber oberflächlich geschädigten Zellen durch die UV-Strahlung abgetötet. Auffällig ist, dass die Phasen 1 und 3 im für diese Arbeit ermittelten Verlauf langsamer verlaufen als von Moisan *et al.* (2002) beschrieben, Phase 2 jedoch schneller. Daraus kann geschlossen werden, dass die Mechanismen der drei Phasen nicht strikt voneinander zu trennen sind. Außerdem wird in dieser Publikation nicht genau beschrieben, wie die Inaktivierung in Phase 1 verläuft. Für die Plasmabehandlung von *Monilinia*-Myzel kann deshalb anhand des Kurvenverlaufs in Abbildung 20 davon ausgegangen werden, dass in Phase 1 vor allem bereits beschädigte Hyphen durch die UV-Strahlung abgetötet werden. Parallel dazu wird die Oberfläche der Hyphen-Zellwand durch UV-Strahlung und Radikale erodiert. Diese Schädigung zeigt sich dann deutlich in Phase 2, in welcher der größte Teil der Hyphen abgetötet wird. Da die von Moisan *et al.* (2002) beschriebenen Erosionsmechanismen nur bei einem mit Sauerstoff substituierten Argon-Plasma beobachtet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass bei den für diese Arbeit durchgeführten Plasmabehandlungen mit Raumluft als Arbeitsgas ebenfalls Sauerstoffradikale die Substratoberfläche erreicht haben und die Wirkung des Plasmas unter anderem dadurch bestimmt wurde. Durch den im Luftplasma enthaltenen Stickstoff entstehen zudem NO-Radikale, deren Zerfall den Großteil der UV-Strahlung im Plasma verursacht. Dieser Prozess ist nach Moisan *et al.* (2002) der hauptsächliche Wirkmechanismus einer Plasmabehandlung dieser Art.

Die Plasmabehandlungen von Myzel und Sporen von *M. laxa* wurden zunächst auf PDA-Platten als Modellsubstrat durchgeführt. Zu diesen Behandlungen zählten die Vorversuche mit 5 Minuten Behandlungsdauer, die nachfolgenden Zeitreihen zur Bestimmung einer optimalen Behandlungszeit sowie die Versuche zur Plasmacharakterisierung mit MgF_2 Filtern (siehe Kapitel 3.6) und zur Überprüfung eines möglichen Temperatureffektes (siehe Kapitel 3.1.2). Dabei hat die Temperaturüberwachung der PDA-Platten während einer 10-minütigen Plasmabehandlung gezeigt, dass die Temperatur einen maximalen Wert von 38,3 °C erreicht. Die Versuche zur Überprüfung eines Temperatureffektes auf das Myzel während der Plasmabehandlung haben gezeigt, dass keine der Temperaturen ein verringertes Wachstum der Kulturen verursacht. Aufgrund dessen wird angenommen, dass die Erwärmung des PDA auf 38,3 °C während der Plasmabehandlungen die Wirkung des Plasmas nicht beeinflusst. Sowohl bei den Vorversuchen zur Behandlung von Myzel als auch bei den nachfolgenden Zeitreihen wurde im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion an wachsenden Hyphen auf dem Modellsubstrat festgestellt. Aufgrund dessen und aufgrund der beschriebenen Beobachtungen kann deshalb davon ausgegangen werden, dass PDA als

Modellsubstrat für die Untersuchung einer grundsätzlichen Wirksamkeit einer Plasmabehandlung gegen Myzel geeignet ist.

4.4 Plasmabehandlung von Sporen

Im Gegensatz zu den zufriedenstellenden Ergebnissen mit Myzel auf PDA konnte mit Sporen auf Agarplatten keine Wirkung einer Plasmabehandlung auf die Sporenkeimung festgestellt werden. Da keine der untersuchten Behandlungszeiten einen Effekt gezeigt hat, wurden verschiedene Ursachen vermutet. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass PDA als Modellsubstrat für Sporen nicht geeignet ist. Damit die Sporen vor der Plasmabehandlung nicht auskeimen, wurden sie direkt vor der Plasmabehandlung ausplattiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass anschließend kein Flüssigkeitsfilm mehr auf der Platte vorhanden war, welcher die wirksamen Bestandteile des Plasmas abschirmen könnte. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass eine restliche Feuchtigkeit auf den Platten zurückgeblieben ist, wodurch die Wirksamkeit des Plasmas eingeschränkt wurde. Eine weitere Option ist, dass die Sporen aufgrund ihrer runden Form in den Agar eingesunken sind und deshalb durch die Plasmabestandteile nicht mehr erreicht wurden. Um für die Sporen eine Alternative zu PDA als Modellsubstrat zu schaffen, wurden Versuche zur Ausbringung von Sporen auf eine PET-Folie und deren Eignung als Modellsubstrat durchgeführt. Für die Plasmabehandlung wurden die Folienstücke auf einer Metallhalterung mit Aussparung befestigt und über der Plasmaflamme angebracht. Dabei wurde festgestellt, dass die Folie sehr schnell Temperaturen von über 80 °C erreicht. Zur Kühlung der Substratfläche wurde deshalb zunächst ein dünner Wasserfilm auf der Rückseite aufgebracht. Da sich dieser nicht als ausreichend kühlend erwies, wurde in der Folge 70 %iger Alkohol zur Kühlung verwendet. Mit diesem Mittel stieg die Temperatur der Folie auf maximal 36,2 °C. Allerdings war es kaum vermeidbar, dass Reste des Alkohols auf der Folie verblieben. Auch während der Plasmabehandlung bestand die Möglichkeit, dass der Alkohol durch die Folie diffundiert und so die Wirkung des Plasmas beeinflusst. Aus den genannten Gründen erscheint die Verwendung einer PET-Folie als Modellsubstrat für Sporen bei einer Behandlung mit einem Mikrowellen Plasmabrenner nicht geeignet.

In Literaturquellen ist durchaus die Verwendung von Agarplatten als Substrat zur Plasmabehandlung von Sporen beschrieben (Xiong *et al.*, 2010; Klämpfl *et al.*, 2012). Dabei wurde eine erschwerte Abtötung von Pilzsporen im Vergleich zu Bakterienzellen beobachtet. Ein Zusammenhang mit dem verwendeten Substrat wurde dabei jedoch nicht hergestellt. Im Gegensatz dazu haben Montie *et al.* (2000) Unterschiede in der Wirksamkeit einer Plasmabehandlung in Abhängigkeit von der Substratoberfläche festgestellt. Dabei war die Plasmabehandlung auf einer Kunststofffolie effektiver als auf Glas, auf Glas wiederrum effektiver als auf Agar. Allerdings wurden die Sporen für diese Versuche der Formulierung nach in Agar eingebettet und nicht wie in dieser Arbeit oberflächlich ausplattiert. Da Sporen

eine geringfügig dickere Zellmembran (0,2 µm) besitzen als Hyphen (0,15 µm, Webster und Weber, 2007), ist es möglich, dass die Plasmabehandlung mit den für diese Arbeit gewählten Parametern nicht ausreichend wirksam ist. Zusätzlich zur höheren Zellwandstärke kann unter Umständen auch in der Zellwand der Sporen eingelagertes Melanin die Ursache für die fehlende Wirksamkeit der Plasmabehandlung sein. Nach Rehnstrom und Free (1996) sind Konidien von *Monilinia fructicola* durch Melanineinlagerungen vor Stressfaktoren wie UV-Strahlung geschützt. Ein weiterer Schritt wäre deshalb nun die Überprüfung längerer Behandlungszeiten von bis zu einer halben Stunde. Hierbei muss eine Erwärmung der Agarplatten berücksichtigt und eventuell durch Kühlung vermieden werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Anpassung der Plasmaparameter, um die Wirksamkeit zu erhöhen. Hierfür müsste jedoch zunächst eine exakte Charakterisierung der Plasmabestandteile mittels optischer Emissionsspektroskopie durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Überprüfung der Wirksamkeit kalter Plasmaquellen wie beispielsweise einer dielektrisch behinderten Entladung (DBE; siehe Kapitel 4.7).

Für die Plasmabehandlung von Sporen des Pilzes *Aspergillus parasiticus* auf Nüssen wurde auch nach 20 Minuten Behandlungsdauer nur eine Reduktion von 1-2 log erreicht. Nach Verwendung von SF_6 (Schwefelhexaflourid) als Arbeitsgas konnte eine vollständige Reduktion der Sporen erreicht werden, aber auch hierfür wurden je nach Inkubationsdauer des Inokulums auf den Nüssen 5-15 Minuten Behandlungsdauer benötigt. Durchgeführt wurden die Versuche mit einem Niederdruckplasma (Basaran *et al.*, 2008). Eine Plasmabehandlung von Bakterien (*E. coli, Salmonella spp.* und *Listeria monocytogenes*) auf Apfel, Salat und Melone mit einem Glimmentladungsplasma bei Atmosphärendruck und mit Luft als Arbeitsgas ermöglichte eine Reduktion von bis zu 5 log nach einer 5-minütigen Behandlungsdauer. Schon nach einer Minute konnten hier deutlich verringerte Keimzahlen festgestellt werden (Critzer *et al.*, 2007). Diese Beispiele zeigen, dass die Behandlungsdauer in Abhängigkeit des Organismus und der Substratoberfläche stark schwanken kann. Zudem scheinen Pilzsporen deutlich weniger sensitiv zu sein als Bakterienzellen (Xiong *et al.*, 2010; Klämpfl *et al.*, 2012). Weitere Unterschiede ergeben sich durch die Erzeugungstechnik des Plasmas und das verwendete Arbeitsgas (siehe Kapitel 1.5). Da die Verwendung von reinen Gasen oder speziellen Gasgemischen jedoch mit erhöhten Kosten und mit eventuellen Rückständen wie beispielsweise Schwefel- oder Fluor-Verbindungen verbunden ist, sollte der Fokus auf der Optimierung eines Plasmas mit Luft als Arbeitsgas liegen.

4.5 Inokulation und Plasmabehandlung von Zwetschgen

Um die Wirkung einer Plasmabehandlung gegen Erreger auf der Frucht zu überprüfen, wurden Zwetschgen im Labor mit Sporen und Myzel von *Monilinia laxa* inokuliert. Dabei wurde zunächst versucht, intakte Fruchtoberflächen zu infizieren. Sowohl mit Myzelsuspension als auch mit Sporensuspension konnte so allerdings keine Infektion

erreicht werden. Auch eine nach Benito *et al.* (1998) durchgeführte Vorkonditionierung der Sporen in Zuckerlösung verbesserte die Infektionsbedingungen hierfür nicht. Durch die Verletzung der Fruchtoberfläche durch mehrmaliges Abreiben mit Sandpapier konnten in folgenden Versuchen Infektionen erreicht werden. Dabei führten Inokulationen mit Sporensuspensionen zu regelmäßigeren Ergebnissen als Inokulationen mit Myzelsuspensionen.

Früchte, welche in Zukunft nach der Ernte einer Plasmabehandlung unterzogen werden sollen, haben eine intakte Oberfläche auf der im Idealfall noch keine Infektion stattgefunden hat. Sporen und Myzel des Erregers befinden sich demnach auf der Oberfläche der Fruchthaut. Zudem wirken die Plasmakomponenten ausschließlich oberflächlich. Für eine praxisnahe Versuchsdurchführung ist eine Inokulation verletzter Früchte deshalb wenig geeignet. Die Ergebnisse einer 5- und 10-minütigen Plasmabehandlung verletzter und inokulierter Früchte haben diese Theorie bestätigt. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollfrüchten konnte keine statistisch signifikante Reduzierung des Läsionsdurchmessers erreicht werden. Durch die für eine Infektion erforderliche Verletzung der Fruchthaut mit Sandpapier konnten die Sporen direkt in das Fruchtfleisch gelangen, wo sie von den Plasmabestandteilen nicht mehr erreicht wurden. Das Versuchsprotokoll sollte deshalb für die beschriebenen Vorversuche mit künstlich inokulierten Früchten entsprechend optimiert werden, um die Bedingungen für eine Infektion intakter Früchte zu verbessern.

Für das Durchdringen der Epidermis mit einer Infektionshyphe sind besondere Bedingungen notwendig, die im Labor nur schwer geschaffen werden können. Eine Möglichkeit wäre hier die Inokulation der Früchte mit Sporen in Zuckerlösung, indem diese nach der Vorinkubation nicht wie in den hier durchgeführten Versuchen durch Ringerlösung ersetzt wird. Die enthaltenen Zucker unterstützen das Wachstum der Infektionshyphe (Benito *et al.*, 1998) und könnten so während des Keimvorgangs direkt zur Verfügung stehen. Die Verfügbarkeit von Feuchtigkeit ist ebenso ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Infektion. Nach Luo und Michailides (2003) sowie Casals *et al.* (2010) stellt eine relative Luftfeuchtigkeit (RH, relative humidity) von 95 % für *Monilinia spp.* das Minimum dar, bei dem eine hohe und zuverlässige Keimrate der Sporen erreicht werden kann. Tamm und Fluckiger (1993) berichten für *M. laxa* von einem Minimum von 97 % RH. Die Feuchtigkeit in den Kunststoffboxen, in welchen die Früchte nach der Infektion gelagert werden, könnte deshalb beispielsweise durch ein Auskleiden der Boxen mit angefeuchtetem Filterpapier entsprechend erhöht werden (Fourie und Holz, 1995). Pascal *et al.* (1994) inkubierten die Früchte in luftdichten Kunststoffboxen ohne das Inokulum vorher trocknen zu lassen, um die Verfügbarkeit von Wasser für die Sporenkeimung zu gewährleisten.

Abhängig von der Stärke der Kutikula und Epidermis einer Fruchthaut gibt es mehr oder weniger für Infektionen durch *Monilinia spp*. anfällige Pfirsichsorten (Adaskaveg *et al.*, 1989;

Adaskaveg *et al.*, 1991). Diese Möglichkeit könnte auch bei Zwetschgen und ihrer Anfälligkeit für *Monilinia spp.* der Fall sein. Diese Eigenschaften können den Erfolg einer künstlichen Inokulation beeinflussen und sollten bei der Wahl der Früchte für einen Versuch beachtet werden. Ebenso kann die künstliche „Ein-Punkt-Inokulation“ im Vergleich zur zufälligen Inokulation an mehreren Stellen der Frucht am Baum ein Nachteil sein, wenn die Sporen an dieser Stelle nicht auf eine Spaltöffnung oder einen Mikroriss in der Haut treffen über die sie die Epidermis der Frucht überwinden können (Fourie und Holz, 1995). Eine Infektion intakter Zwetschgen könnte außerdem begünstigt werden, indem Früchte verwendet werden, welche während der Saison nicht mit Fungiziden behandelt wurden (Fourie und Holz, 2006; Pascal *et al.*, 1994).

Im Balkendiagramm zur Plasmabehandlung künstlich inokulierter Zwetschgen (Abbildung 25) ist ein leichter Trend hin zu einem verringerten Läsionsdurchmesser zu erkennen. Deshalb wäre eine weitere Möglichkeit, die Wirkung der Plasmabehandlung gegen *Monilinia laxa* auf Zwetschge zunächst grundsätzlich zu zeigen, eine Erhöhung der Behandlungsdauer auf 15 oder 20 Minuten. Hierbei würde jedoch auch bei gekühlten Früchten die Temperatur der Fruchthaut über den kritischen Wert von 36 °C steigen und die Beduftung schmelzen. In diesem Fall könnte die Plasmabehandlung auf zwei Behandlungen à 10 Minuten aufgeteilt werden, um die Früchte zwischendurch wieder abzukühlen. Wie bei der Plasmabehandlung von Sporen und Myzel ist auch hier eine Anpassung der Plasmaparameter oder der Einsatz einer kalten Plasmaquelle (DBE) eine Möglichkeit, die Wirksamkeit der Plasmabehandlung zu optimieren (die Vorteile einer DBE sind in Kapitel 4.7 genauer beschrieben).

4.6 Mögliche Auswirkungen der Plasmabehandlung auf die Fruchtqualität

Damit negative Einflüsse der Plasmabehandlung auf die Fruchtqualität ausgeschlossen werden konnten, wurden gesunde Zwetschgen mit Plasma behandelt. Anschließend wurden Farbe, Fruchtfleischfestigkeit, Zucker, Säure, Vitamin C und Polyphenole der behandelten Früchte mit unbehandelten verglichen. Bei keinem der Parameter konnte dabei ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten nachgewiesen werden. Die für diese Arbeit durchgeführte Plasmabehandlung von Zwetschgen hat demnach keinen Einfluss auf die untersuchten Fruchtqualitätsparameter. Um eine übermäßige Erhitzung der Früchte zu verhindern, wurden diese jedoch lediglich einseitig für 2,5 Minuten behandelt. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass die Plasmabehandlung für eine Veränderung der Qualitätsparameter zu kurz war. In Literaturquellen konnten durchaus Hinweise für Effekte gefunden werden (Grzegorzewski *et al.* 2010; Baier *et al.*, 2015; Bußler *et al.*, 2015). Zudem wurde ein wichtiger Parameter, die kristalline Wachsschicht der Zwetschgen, nicht auf optische oder molekulare Strukturveränderungen hin untersucht. Der im Plasma vorkommende atomare Sauerstoff kann nicht nur ätzende Wirkungen auf Oberflächen entfalten, sondern auch zur Bildung von polaren Gruppen führen (Surowsky *et al.*, 2014a).

Die Folge ist eine erhöhte Oberflächenspannung und dadurch eine verbesserte Haftbarkeit und Benetzbarkeit. So haben Grzegorzewski *et al.* (2010) gezeigt, dass die Behandlung von Feldsalat mit einem Glimmentladungsplasma bei Niederdruck mit Sauerstoff als Arbeitsgas zu einer erhöhten Benetzbarkeit der Blattoberfläche führt. Außerdem wurde ein zeitabhängiges Abtragen der Wachsschicht und des Cutins der Blattepidermis beobachtet. Demnach ist es durchaus möglich, dass die Plasmabehandlung von Zwetschgen zu Veränderungen in der Oberflächenstruktur der Früchte führen kann. Die Beduftung der Zwetschgen stellt ein bedeutendes Qualitätskriterium dar und dient zudem als Teil der kutikulären Membran als Schutzbarriere für Krankheitserreger (Knoche und Peschel 2007; Lara *et al.*, 2014). Die Plasmaparameter sollten deshalb so angepasst werden, dass nach einer Behandlung der Früchte keine nennenswerten Veränderungen der Zwetschgenoberfläche nachweisbar sind. Neben den oberflächlichen Veränderungen wurde in dieser Arbeit (Grzegorzewski *et al.* 2010) bereits nach einer Behandlungszeit von 120 Sekunden ein Abbau von Flavonoiden festgestellt, wohingegen die Konzentration der phenolischen Verbindungen Protocatechusäure, Luteolin und Disometin signifikant zunahm. Zurückgeführt wurden auch diese Beobachtungen auf die im Plasma vorkommenden Sauerstoffradikale. Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass eine Plasmabehandlung auch den Sekundärstoffwechsel von Zwetschgen und damit den Gehalt an Polyphenolen beeinflussen kann. Eine solche Veränderung der Fruchtinhaltsstoffe kann sowohl negativ als auch positiv bewertet werden. Nicht gewünscht wäre ein Abbau der gesundheitsförderlichen Stoffe wie der Phenole oder Vitamin C. Eine Anregung ihrer Synthese durch eine Plasmabehandlung könnte jedoch durchaus als ein positiver Effekt gewertet werden, welcher die Qualität einer Frucht erhöhen würde (Tomás-Barberán und Espin 2001). Eine vergleichende Untersuchung verschiedener Fruchtqualitätsparameter an mehreren Obst und Gemüsesorten nach einer Behandlung mit einem Mikrowellenplasma bei Atmosphärendruck (indirekte Behandlung, Arbeitsgas Luft) hat gezeigt, dass die Behandlungen spezifisch für jede Art von Substrat angepasst werden sollte, um Produktqualität und -sicherheit gewährleisten zu können (Baier *et al.*, 2015). So wurden unter anderem Unterschiede im Effekt auf die Farbe der Frucht festgestellt. Bei Tomaten und Karotten konnte beispielsweise ein signifikanter Effekt festgestellt werden, nicht jedoch bei Gurken. Auf die Festigkeit des jeweiligen Produktes wurden in diesem Fall keine Effekte festgestellt.

Eine Behandlung von Bohnensamen und -keimlingen (*Pisum sativum* ‘Salamanca’) mit einem kalten Plasma bei Atmosphärendruck (DBE, Arbeitsgas Luft) führte zu einer erhöhten Keimrate der Samen und einem größeren Trockengewicht der Keimlinge, gleichzeitig jedoch zu einer verringerten Wachstumsrate der Keimlinge. Zusätzlich wurde in Abhängigkeit von der Behandlungshäufigkeit (1, 2 oder 3-mal) eine Reduktion der Konzentration von

Flavonoidglykosiden gemessen. In Samen und Keimlingen wurde eine reduzierte photosynthetische Aktivität festgestellt. Auch diese Ergebnisse zeigen eine zeitabhängige Wirkung der Plasmabehandlung auf den Pflanzenstoffwechsel. Dabei war die Reaktion der Keimlinge auf die Plasmabehandlung stark vom Zeitpunkt und der Dauer der Behandlung abhängig (Bußler *et al.*, 2015).

4.7 Praktische Anwendung einer Plasmabehandlung

Die genannten Nebeneffekte und Probleme einer Plasmabehandlung könnten durch den Einsatz eines kalten Nichtgleichgewicht-Plasmas verhindert werden. Erzeugt werden kann ein solches Plasma beispielsweise mit einer DBE (Kogelschatz *et al.*, 1999; Trampert, 2008). Diese kommt zustande, indem eine hochfrequente Hochspannung an zwei Elektroden angelegt wird, welche durch eine dielektrische Barriere (Isolator) getrennt sind (typische dielektrische Materialien sind Glas, Quarz, Keramik oder Polymere). Durch die Hochspannung würde sich eigentlich ein Lichtbogen ausbilden, der aber durch das nicht leitende Dielektrikum verhindert wird. Maximal können also je Halbwelle der Hochspannung lokale Oberflächenladungen abfließen. Der Stromfluss findet dabei auf einer Zeitskala von etwa 50 ns statt. In dieser Zeit können die Elektronen nahezu keinen Impuls auf die schweren Gasteilchen übertragen. Somit kann auch das Gas nicht aufgeheizt werden. Jedoch können die Elektronen mittels inelastischer Stöße Energie auf die Gasteilchen übertragen, die dann ionisiert, dissoziiert oder angeregt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Art der Entladung ist die hohe Effizienz. Allein 65 % der elektrischen Leistung werden in Strahlungsleistung im VUV Bereich umgesetzt (Vollkommer und Hitzschke 1994). Durch Umsetzung der verbleibenden elektrischen Energie in Dissoziation, Ionisation und Anregung (Plasmaerzeugung) kann demnach ein Wirkungsgrad von nahezu 100 % erreicht werden. Im Falle des für diese Arbeit verwendeten Mikrowellenbrenners liegt die Effizienz hingegen bei unter 10 % der Mikrowellenleistung, 90 % gehen in der Gastemperatur verloren (Leins, 2010). Hinzu kommt, dass nur etwa 60-80 % der elektrischen Anschlussleistung in Mikrowellenleistung transferiert wird, der Rest geht in der Elektronik und als Abwärme in der Magnetronröhre verloren (Reichmann, 2010). Durch die Erzeugung des Plasmas mit einer DBE könnte dieser Energieverlust minimiert werden.

Anhand einer Beispielrechnung werden im Folgenden die Kosten einer Behandlung mit Plasma aus dem eingesetzten Mikrowellenbrenner beschrieben. Zur Erzeugung von 1 kW Mikrowellenleistung wird 1,6 kW elektrische Leistung benötigt. Bei einem aktuellen Preis von etwa 20 Eurocent pro Kilowattstunde, kostet eine Plasmabehandlung von 10 Minuten rund 5,2 Cent (1,6 kW x 10 Min = 16 kWMin = 0,26 kWh). Bei der aktuell verfügbaren Fläche über der Pappröhre des Mikrowellenplasmabrenners (Abbildung 6C) könnten in dieser Zeit etwa 7 Zwetschgen gleichzeitig behandelt werden. Geht man von einem mittleren Fruchtgewicht von 30 g aus, können mit einem Mikrowellenplasmabrenner dieser Art etwa 1,26 kg Zwetschgen

in einer Stunde behandelt werden (30 g x 7 x 6). Die Mehrkosten pro kg liegen dann bei 24-25 Cent. Bei einem durchschnittlichen Preis von 70 Cent für ein kg Zwetschgen auf dem Großmarkt, bedeutet das eine Preiserhöhung von rund 35 %. Eine Plasmabehandlung derselben Dauer wäre mit einer DBE als Plasmaquelle etwa um etwa den Faktor 100 günstiger.

Um eine Plasmabehandlung in der praktischen Anwendung rentabel zu gestalten, muss vor allem der Kostenfaktor beachtet werden. Bedeutende Bestandteile sind hier die beschriebenen Energiekosten, die Wirksamkeit der Behandlung sowie die hierfür notwendige Behandlungsdauer. Ersteres kann durch den Einsatz einer geeigneten Quelle (beispielsweise einer DBE) und beispielsweise auch durch die Verwendung von erneuerbaren Energiequellen wirksam reduziert werden. Die Wirksamkeit einer Plasmabehandlung ist abhängig von und variabel durch die beeinflussenden Parameter (für eine detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 1.5). Diese sind die Art der verwendeten Plasmaquelle, die Art der Plasmabehandlung (direkt oder indirekt), das Arbeitsgas (Luft, reine Gase wie Sauerstoff und Stickstoff, Edelgase, spezifische Gasgemische, etc.), der Umgebungsdruck (Atmosphärendruck oder Niederdruck), die Art der eingesetzten Energiequelle und der Gasfluss. Diese Parameter definieren die Plasmatemperatur, den Ionisationsgrad, die Elektronendichte, die Elektronentemperatur, die Konzentration an reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies sowie die auftretende UV-Strahlung. Kann die Wirksamkeit eines Plasmas durch die Anpassung der genannten Parameter optimiert werden, reduzieren sich die Behandlungsdauer und die Kosten entsprechend.

Die Infektion von Früchten in der Obstanlage geschieht durch Ascosporen und Konidien aus primären oder sekundären Quellen (siehe Kapitel 1.3; Agrios, 2005). Unter ungünstigen Infektionsbedingungen können diese Infektionen latent verlaufen und erst unter geeigneten Bedingungen zur Fruchtfäule führen (Adaskaveg *et al.*, 2000). Je nach Voraussetzung kann diese während der gesamten Saison am Baum, zur Ernte oder in der Nacherntezeit auftreten. Zu den kritischen Bedingungen gehören der Infektionsgrad, das Entwicklungsstadium der Frucht, die Menge an vorhandenem Inokulum sowie die verfügbare Feuchtigkeit (Luo und Michailides, 2003). Latente Infektionen können in Form von ungekeimten Sporen auf der Fruchtoberfläche, symptomfreien Infektionen unter der Fruchthaut oder im Fruchtfleisch, bis hin zu sichtbaren aber sich nicht ausbreitenden Symptomen wie beispielsweise Verfärbungen vorkommen (Jarvis, 1994; Luo und Michailides, 2003). Von *Monilinia fructicola* ist bekannt, dass Strukturen davon latent in Steinobst vorkommen können aber auch *Monilinia laxa* kann latente Strukturen in Steinobst ausbilden (Jenkins und Reinganum, 1965; Gell *et al.*, 2008). Das Risiko latenter Infektionen kann bereits durch angemessene Maßnahmen vor der Ernte wie beispielsweise Hygiene (entfernen von Inokulumquellen) und Fungizidanwendungen reduziert werden. Die Verluste

von Zwetschgen nach der Ernte zeigen jedoch, dass mit diesen Maßnahmen nicht alles Inokulum entfernt werden kann (Fritsch, 2009a). Aus diesem Grund könnten wirksame und rückstandsfreie Methoden nach der Ernte hilfreich sein. Eine Plasmabehandlung der Früchte während der Kommissionierung und des Abpackvorgangs stellt eine solche Methode dar. Da der Erreger zu diesem Zeitpunkt bereits unter der Fruchthaut oder im Fruchtfleisch vorkommen kann, ist es jedoch fraglich, ob dieser von den oberflächlich wirksamen Bestandteilen des Plasmas erreicht wird. Unter Umständen kann hier ein verstärkender Effekt durch eine parallel oder zusätzlich verlaufende Wärmebehandlung sinnvoll sein (Marquenie *et al.*, 2002). Jedoch müssen auch im Falle einer erfolgreichen Anwendung der Plasmatechnik in der Nachernte weiterhin zusätzliche Maßnahmen zur Unterdrückung des Pilzes, wie beispielsweise angemessene Kühlung und schnelle Vermarktung oder auch weitere physikalische Behandlungen, in Form einer wirksamen Strategie durchgeführt werden.

4.8 Schlussfolgerung

Die Hypothese, dass die Plasmabehandlung von *Monilinia laxa* zu einer signifikanten Reduktion des Wachstums von Myzel und der Keimung von Sporen führt, konnte mit dieser Arbeit teilweise bestätigt werden. Eine für eine verbesserte Haltbarkeit der Früchte notwendige Reduktion von mehr als 90 % der wachstumsfähigen Hyphen wurde nach einer 10-minütigen Plasmabehandlung einer Myzelsuspension auf Agarplatten erreicht. Für eine Umsetzung dieser Technik in die Praxis ist diese Behandlungsdauer jedoch zu lang. Die Kosten für ein kg Zwetschgen würden sich dadurch mit der angewandten Technik um 24-25 Cent erhöhen.

Die Abtötung von *Monilinia*-Myzel zeigt einen charakteristischen, 3-phasigen Verlauf. Dabei sind die Hauptwirkmechanismen des mit Raumluft erzeugten Plasmas UV-Strahlung aus angeregten NO-Molekülen sowie Sauerstoffradikale. Das Zusammenwirken dieser Mechanismen wurde durch das Abschirmen der Radikale mithilfe eines MgF_2 Filters während Plasmabehandlungen bestätigt. Für eine genaue Charakterisierung der Radikale am Substrat sollte das Plasmagas jedoch weiter mittels optischer Emissionsspektroskopie analysiert werden. Das Keimen der Sporen konnte mit einer Plasmabehandlung von bis zu 10 Minuten nicht verhindert werden. Ob die Ursache dafür in einer größeren Resistenz der Sporen gegenüber den Wirkmechanismen in den Plasmaparametern oder dem gewählten Modellsubstrat liegt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

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

Die Analyse der wichtigsten Qualitätsparameter plasmabehandelter Früchte hat ergeben, dass die durchgeführte Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wie erwartet keine Effekte auf Farbe, Fruchtfleischfestigkeit, Zucker- und Säuregehalt, die Vitamin C-Konzentration und das Polyphenolspektrum bewirkt hat. Da die Plasmabehandlung hier jedoch lediglich für 2,5 Minuten durchgeführt wurde, besteht die Annahme, dass diese Dauer für einen messbaren Effekt zu kurz war. Da eine Plasmabehandlung nur mit einer möglichst kurzen Anwendungsdauer wirtschaftlich bleibt, ist eine 2,5-minütige Behandlung der Früchte jedoch durchaus realistisch. Nicht näher analysiert wurde der Effekt der Behandlung auf die strukturelle Beschaffenheit der Fruchtoberfläche wie beispielsweise der kristallinen Wachsschicht. Da diese Beduftung ein unverzichtbares Qualitätsmerkmal ist und zudem einen Schutz der Frucht vor Krankheitserregern bietet (Knoche und Peschel, 2007; Lara *et al.*, 2014), sollten entsprechende Untersuchungen vor einem Einsatz der Methode in der Praxis durchgeführt werden.

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

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

5. Literaturverzeichnis

Adaskaveg, J. E., Feliciano, A., Ogawa, J., 1991. Evaluation of the cuticle as a barrier to penetration by *Monilinia fructicola*. Phytopathology, 81, 1150-1150.

Adaskaveg, J. E., Feliciano, A., Ogawa, J., 1989. Comparative studies of resistance in peach genotypes to *Monilinia fructicola*. Phytopathology, 79, 1183-1184.

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

Agrios, G. N., 2005. Plant Pathology. 5th Edition, Academic Press Inc., New York, USA.

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

Baier, R. E., Carter, J. M., Sorensen, S. E., Meyer, A. E., McGowan, B. D., Kasprzak, S. A., 1991. Radiofrequency gas plasma (glow discharge) disinfection of dental operative instruments, including handpieces. The Journal of Oral Implantology, 18, 236-242.

Baier, M., Ehlbeck, J., Knorr, D., Herppich, W. B., Schlüter, O., 2015. Impact of plasma processed air (PPA) on quality parameters of fresh produce. Postharvest Biology and Technology, 100, 120-126.

Basaran, P., Basaran-Akgul, N., Oksuz, L., 2008. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. Food Microbiology, 25, 626-632.

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

Biggs, A. R., Northover, J., 1985. Inoculum sources for *Monilinia fructicola* in Ontario peach orchards. Canadian Journal of Plant Pathology, 7, 302-307.

Boehm, E. W. A., Ma, Z., Michailides, T. J., 2001. Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. Phytopathology, 91, 428-439.

Bußler, S., Herppich, W. B., Neugart, S., Schreiner, M., Ehlbeck, J., Rohn, S., Schlüter, O., 2015. Impact of cold atmospheric pressure plasma on physiology and flavonol glycoside profile of peas (*Pisum sativum* ‘Salamanca’). Food Research International, 76, 132-141.

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

Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., Silvera, E., Lamarca, N., Usall, J., 2010. Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. European Journal of Plant Pathology, 128, 51-63.

Casals, C., Viñas, I., Torres, R., Griera, C., Usall, J., 2010. Effect of temperature and water activity on in vitro germination of *Monilinia spp.* Journal of Applied Microbiology, 108, 47-54.

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

Crisosto, C. H., Mitchell, F. G., Johnson, S., 1995. Factors in fresh market stone fruit quality. Postharvest News and Information, 6, 17-21.

Crisosto, C. H., Johnson, R. S., DeJong, T., Day, K. R., 1997. Orchard factors affecting postharvest stone fruit quality. HortScience 32, 820–823.

Crisosto, C. H., Garner, D., Crisosto, G. M., Bowerman, E., 2004. Increasing ‘Blackamber’ plum (*Prunus salicina* Lindell) consumer acceptance. Postharvest Biology and Technology, 34, 237-244.

Critzer, F. J., Kelly-Wintenberg, K., South, S. L., Golden, D. A., 2007. Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. Journal of Food Protection, 70, 2290-2296.

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

Droby, S., Wisniewski, M., El Ghaouth, A., Wilson, C., 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. Postharvest Biology and Technology, 27, 127-135.

Duchoslavová, J., Širucková, I., Zapletalová, E., Navrátil, M., Šafárová, D., 2007. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on various stone and pome fruits in the Czech Republic. Plant Disease, 91, 907-907.

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

European and Mediterranean Plant Protection Oganization (EPPO), 1988. *Monilinia fructicola* (Winter) Honey. Report service no.18. http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm (Stand 17.11.2015).

European and Mediterranean Plant Protection Oganization (EPPO), 2002. First report of *Monilinia fructicola* in France. Report service no. 001, http://archives.eppo.int/EPPOReporting/2002/Rse-0201.pdf (Stand 17.11.2015).

European and Mediterranean Plant Protection Oganization (EPPO), 2009. EPPO Standard PM 7/18 (2) Diagnostic protocols for regulated pests. *Monilinia fructicola*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39, 337-343.

European Council, 2000. Council Directive 2000/29/EC of 8th May 2000 on protective measures against the introduction into the community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the community. Official Journal of the European Communities, 50, 1-159.

Feichtinger, J., Schulz, A., Walker, M., Schumacher, U., 2003. Sterilisation with low-pressure microwave plasmas. Surface and Coatings Technology, 174–175, 564-569.

Fernandez, A., Noriega, E., Thompson, A., 2013. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. Food Microbiology, 33, 24-29.

Fourie, J., Holz, G., 1995. Initial infection processes by *Botrytis cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. Phytopathology, 85, 82-87.

Fourie, P., Holz, G., 2006. Wound infection of plum fruit by airborne conidia of *Monilinia laxa*. Australasian Plant Pathology, 35, 435-439.

Fritsch, S., Hinrichs-Berger, J., Elias, E., 2009. *Monilia* auf Zwetschenfrüchten - Inkubationszeit in Abhängigkeit der Lagertemperatur. Obstbau, 8, 435-437.

Fritsch, S., 2009a. Die *Monilia*-Pilzkrankheit an Zwetschen. Obstbau, 4, 217-220.

Fritsch, S., 2009b. Die *Monilia*-Pilzkrankheit an Zwetschen. Merkblatt LTZ Augustenberg, Karlsruhe, Deutschland. http://www.ltz-bw.de/pb/site/pbs-bw-new/get/documents/MLR.LEL/PB5Documents/ltz_ka/Arbeitsfelder/Pflanzenschutz/Schadorganismen/Krankheiten/Pilz-Krankheiten/Monilia-Pilzkrankheit_Zwetschen_DL/Monilia%20an%20Zwetschen%5B1%5D.pdf (Stand 17.11.2015).

Fritsch, S., Hinrichs-Berger, J., 2011a. Fungizideinsatz gegen Fruchtmonilia an Zwetschen. Obstbau, 6, 328-333.

Fritsch, S., Hinrichs-Berger, J., 2011b. Haltbare Zwetschen durch sorgfältige Ernte - Bedeutung der Erntebedingungen für den Fruchtmonilia Befall von Zwetschen im Lager. Obstbau, 7, 391-396.

Fröhling, A., Baier, M., Ehlbeck, J., Knorr, D., Schlüter, O., 2012a. Atmospheric pressure plasma treatment of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* at polysaccharide surfaces: Inactivation kinetics and flow cytometric characterization. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 13, 142-150.

Fröhling, A., Durek, J., Schnabel, U., Ehlbeck, J., Bolling, J., Schlüter, O., 2012b. Indirect plasma treatment of fresh pork: decontamination efficiency and effects on quality attributes. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 16, 381-390.

Fuchs, G., 2014. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

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

Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J., Melgarejo, P., 2008. Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia spp.* and the incidence of brown rot of peach fruit: factors affecting latent infection. European Journal of Plant Pathology, 121, 487-498.

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

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

Gregori, R., Borsetti, F., Neri, F., Mari, M., Bertolini, P., 2008. Effects of potassium sorbate on postharvest brown rot of stone fruit. Journal of Food Protection, 71, 1626-1631.

Grzegorzewski, F., Rohn, S., Kroh, L. W., Geyer, M., Schlüter, O., 2010. Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. Food Chemistry, 122, 1145-1152.

Hartmann, A., 2012. Äpfel dominieren den Obstanbau in Baden-Württemberg. Statistisches Monatsheft Nr. 10, Statistisches Landesamt Baden-Württemberg, Deutschland.

Hashizume, H., Ohta, T., Takeda, K., Ishikawa, K., Hori, M., Ito, M., 2015. Quantitative clarification of inactivation mechanism of *Penicillium digitatum* spores treated with neutral oxygen radicals. Japanese Journal of Applied Physics, 54, 01AG05-1-01AG05-5.

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

Holb, I., 2008. Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance and biological control. International Journal of Horticultural Science, 14, 15-21.

Hong, C., Holtz, B. A., Morgan, D. P., Michailides, T. J., 1997. Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. Plant Disease, 81, 519-524.

Jaccard, J., Becker, M. A., Wood, G., 1984. Pairwise multiple comparison procedures: a review. Psychological Bulletin, 96, 589.

Jaiswal, R., Karakose, H., Ruhmann, S., Goldner, K., Neumuller, M., Treutter, D., Kuhnert, N., 2013. Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 12020-12031.

Janzen, G., 1992. Plasmatechnik: Grundlagen, Anwendungen, Diagnostik. Hüthing Buch Verlag GmbH Heidelberg.

Janzen, O., 2011. Untersuchungen zur entkeimenden Wirkung eines Mikrowellenplasmas. Diplomarbeit, IGVP, Universität Suttgart, Deutschland.

Jarvis, W. R., 1994. Latent infections in the pre- and postharvest environment. HortScience, 29, 749-751.

Jenkins, P. T., Reinganum, C., 1965. The occurrence of a quiescent infection of stone fruits caused by *Sclerotinia fructicola* (Wint.) Rehm. Crop and Pasture Science, 16, 131-140.

Karaca, H., Pérez-Gago, M. B., Taberner, V., Palou, L., 2014. Evaluating food additives as antifungal agents against *Monilinia fructicola* in vitro and in hydroxypropyl methylcellulose–lipid composite edible coatings for plums. International Journal of Food Microbiology, 179, 72-79.

Kayano, S., Kikuzaki, H., Fukutsuka, N., Mitani, T., Nakatani, N., 2002. Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3708-3712.

Khadre, M. A., Yousef, A. E., Kim, J. G., 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. Journal of Food Science -Chicago-, 66, 1242-1253.

Kielbassa, C., Roza, L., Epe, B., 1997. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. Carcinogenesis, 18, 811-816.

Kim, D., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H., Lee, C. Y., 2003a. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6509-6515.

Kim, D., Jeong, S. W., Lee, C. Y., 2003b. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry, 81, 321-326.

Kittemann, D., Neuwald, D. A., Streif, J., 2008. GRAS (Generally Recognized As Save) Methods as a possible control of postharvest fungal diseases in sweet cherry. Acta Horticulturae, 858, 363-367.

Klämpfl, T. G., Isbary, G., Shimizu, T., Li, Y. F., Zimmermann, J. L., Stolz, W., Schlegel, J., Morfill, G. E., Schmidt, H. U., 2012. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. Applied and Environmental Microbiology, 78, 5077-5082.

Knoche, M., Peschel, S., 2007. Deposition and strain of the cuticle of developing European plum fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science, 132, 597-602.

Kogelschatz, U., Eliasson, B., Egli, W., 1999. From ozone generators to flat television screens: history and future potential of dielectric-barrier discharges. Pure and Applied Chemistry, 71, 1819-1828.

Landgraf, F. A., Zehr, E. I., 1981. Inoculum sources for *Monilinia fructicola* in South Carolina peach orchards. Phytopathology, 72, 185-190.

Lara, I., Belge, B., Goulao, L. F., 2014. The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. Postharvest Biology and Technology, 87, 103-112.

Laroussi, M., 2005. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. Plasma Processes and Polymers, 2, 391-400.

Leins, M., 2010. Development and spectroscopic investigation of a microwave plasma source for the decomposition of waste gases. Dissertation, IGVP, Universität Stuttgart, Deutschland.

Leins, M., Walker, M., Schulz, A., Schumacher, U., Stroth, U., 2012. Spectroscopic investigation of a microwave-generated atmospheric pressure plasma torch. Contributions to Plasma Physics, 52, 615-628.

Leins, M., Gaiser, S., Schulz, A., Walker, M., Schumacher, U., Hirth, T., 2015. How to ignite an atmospheric pressure microwave plasma torch without any additional igniters. Journal of Visualized Experiments, 98, video article e52816, http://www.jove.com/video/52816/how-to-ignite-an-atmospheric-pressure-microwave-plasma-torch-without (Stand 17.11.2015).

Levene, H., 1960. Robust tests for equality of variance. In Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling. Stanford University Press, 278-292.

Lilliefors, H. W., 1967. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. Journal of the American Statistical Association, 62, 399-402.

Liu, W. T., Chu, C. L., Zhou, T., 2002. Thymol and acetic acid vapors reduce postharvest brown rot of apricots and plums. HortScience, 37, 151-156.

Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Tian, S., Norelli, J., Hershkovitz, V., 2012. Effect of heat treatment on inhibition of *Monilinia fructicola* and induction of disease resistance in peach fruit. Postharvest Biology and Technology, 65, 61-68.

Luo, Y., Michailides, T. J., 2003. Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*. Phytopathology, 93, 102-111.

Manganaris, G., Vicente, A., Crisosto, C., 2008. Effect of pre-harvest and post-harvest conditions and treatments on plum fruit quality. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 3, 1-9.

Mari, M., Gregori, R., Donati, I., 2004. Postharvest control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit by peracetic acid. Postharvest Biology and Technology, 33, 319-325.

Mari, M., Torres, R., Casalini, L., Lamarca, N., Mandrin, J. F., Lichou, J., Usall, J., 2007. Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. Journal of the Science of Food and Agriculture, 87, 1271-1277.

Marquenie, D., Lammertyn, J., Geeraerd, A., Soontjens, C., Van Impe, J., Nicolaï, B., Michiels, C., 2002. Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. International Journal of Food Microbiology, 74, 27-35.

Marquenie, D., Geeraerd, A. H., Lammertyn, J., Soontjens, C., Van Impe, J. F., Michiels, C. W., Nicolaï, B. M., 2003. Combinations of pulsed white light and UV-C or mild heat treatment to inactivate conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena*. International Journal of Food Microbiology, 85, 185-196.

Massey Jr., F. J., 1951. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. Journal of the American Statistical Association, 46, 68-78.

Michailides, T. J., Luo, Y., Ma, Z., Morgan, D. P., 2007. Brown rot of dried plum in California: new insights on an old disease. Online. APSnet Features, http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/BrownRot.aspx (Stand 17.11.2015).

Michailides, T. J., Morgan, D. P., 1997. Influence of fruit-to-fruit contact on the susceptibility of French prune to infection by *Monilinia fructicola*. Plant Disease, 81, 1416-1424.

Misra, N. N., Keener, K. M., Bourke, P., Mosnier, J. P., Cullen, P. J., 2014. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. Journal of Bioscience and Bioengineering, 118, 177-182.

Moan, J., Peak, M. J., 1989. Effects of UV radiation on cells. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 4, 21-34.

Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., Yahia, L. H., 2001. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. International Journal of Pharmaceutics, 226, 1-21.

Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B., 2002. Plasma sterilization. Methods and mechanisms. Pure and Applied Chemistry, 74, 349-358.

Montie, T. C., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J. R., 2000. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. Plasma Science, 28, 41-50.

Muranyi, P., 2008. Einsatz eines Atmosphärendruckplasmas zur Entkeimung von lebensmittelrelevanten Verpackungen aus Kunststoff. Dissertation, Technische Universität München, Deutschland.

Nehra, V., Kumar, A., Dwivedi, H., 2008. Atmospheric non-thermal plasma sources. International Journal of Engineering, 2, 53-68.

Neumüller, M., 2011. Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica*) breeding. Global Science Books. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, 5 (Special Issue 1), 139-156.

Neuwald, D. A., Streif, J., 2010. Changes in ascorbic acid content of 'Elstar' and 'Jonagold' apples treated pre- and post-harvest with ripening inhibitors. Acta Horticulturae, 877, 1275-1280.

Niemira, B. A., Sites, J., 2008. Cold plasma inactivates *Salmonella Stanley* and *Escherichia coli* O157: H7 inoculated on golden delicious apples. Journal of Food Protection, 71, 1357-1365.

Niemira, B. A., Gutsol, A., 2010. Nonthermal plasma as a novel food processing technology. In: Nonthermal Processing Technologies for Food, 1st Edition, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, 271-288.

Ohkawa, H., Akitsu, T., Tsuji, M., Kimura, H., Kogoma, M., Fukushima, K., 2006. Pulse-modulated, high-frequency plasma sterilization at atmospheric-pressure. Surface and Coatings Technology, 200, 5829-5835.

Okie, W. R., Hancock, J. F., 2008. Plums. In: Temperate Fruit Crop Breeding, Springer-Verlag Niederlande, 337-358.

Papavasileiou, A., Testempasis, S., Michailides, T., Karaoglanidis, G., 2015. Frequency of brown rot fungi on blossoms and fruit in stone fruit orchards in Greece. Plant Pathology, 64, 416-424.

Park, J., Bong, J. P., Han, D., Dong, H. L., Lee, I., Hyun, S. O., Chun, M., Chung, K., Aihara, M., Takatori, K., 2004. Fungal sterilization using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 188-192.

Pascal, T., Levigneron, A., Kervella, J., 1994. Evaluation of two screening methods for resistance of apricot, plum and peach to *Monilinia laxa*. Proceedings of the Eucarpia Fruit Breeding Section Meeting at Wädenswil / Einsiedeln, Switzerland August 30th to September 3rd, 1993. In: Progress in Temperate Fruit Breeding, Springer-Verlag, 57-61.

Pellegrino, C., Gullino, M., Garibaldi, A., Spadaro, D., 2009. First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. Plant Disease, 93, 668-668.

Petroczy, M., Palkovics, L., 2006. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on imported peach in Hungary. Plant Disease, 90, 375-375.

Phillips, D., 1971. A medium for the selective growth of *Monilinia* species. Phytopathology, 61, 906-906.

Raizer, Y. P., Allen, J. E., 1997. Gas discharge physics, Volume 2, Springer-Verlag Berlin.

Rehnstrom, A., Free, S., 1996. The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 49, 321-330.

Reichmann, M., 2010. Auslegung von Mikrowellen-Thermoprozess-Anlagen unter Nutzung von hochfrequenz-technischen Prinzipien. Dissertation, Technische Universität Bergakademie Freiberg, Deutschland.

Reineke, K., Langer, K., Hertwig, C., Ehlbeck, J., Schlüter, O., 2015. The impact of different process gas compositions on the inactivation effect of an atmospheric pressure plasma jet on *Bacillus* spores. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 30, 112-118.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry, 66, 401-436.

Schütze, A., Jeong, J. Y., Babyan S. E., Park, J., Selwyn G. S., Hicks, R. F., 1998. The atmospheric pressure plasma jet: A review and comparison to other plasma sources. IEEE Transactions on Plasma Science, 26, 1685-1694.

Siegfried, W., Viret, O., 2010. Die *Monilinia*-Krankheiten. Merkblatt Nr. 303, Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil, Schweiz, http://www.agroscope.admin.ch/publikationen/07717/index.html?pubkeywords=&pubautor=Siegfried&pubjahrvon=2010&pubjahrbis=2010&lang=de&pubsuche=Suchen&flexId=0_0 (Stand: 17.11.2015).

SKLM, 2012. Stellungnahme zum Einsatz von Plasmaverfahren zur Behandlung von Lebensmitteln. DFG Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln. http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/2012/sklm_plasmastellungsnahme_120525.pdf (Stand: 17.11.2015).

Sinha, R. P., Häder, D. P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. Photochemical and Photobiological Sciences, 1, 225-236.

Storey, R., Price, W. E., 1999. Microstructure of the skin of d'Agen plums. Scientia Horticulturae, 81, 279-286.

Surowsky, B., Schlüter, O., Knorr, D., 2014a. Interactions of non-thermal atmospheric pressure plasma with solid and liquid food systems: a review. Food Engineering Reviews, 7, 82-108.

Surowsky, B., Fröhling, A., Gottschalk, N., Schlüter, O., Knorr, D., 2014b. Impact of cold plasma on Citrobacter freundii in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. International Journal of Food Microbiology, 174, 63-71.

Tamm, L., Fluckiger, W., 1993. Influence of temperature and moisture on growth, spore production, and conidial germination of *Monilinia laxa*. Phytopathology, 83, 1321-1326.

Tiede, R., Hirschberg, J., Daeschlein, G., von Woedtke, T., Vioel, W., Emmert, S., 2014. Plasma applications: a dermatological view. Contributions to Plasma Physics, 54, 118-130.

Tomás-Barberán, F. A., Espin, J. C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 853-876.

Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., Kader, A. A., 2001. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4748-4760.

Trampert, K., 2008. Ladungstransportmodell dielektrisch behinderter Entladungen. Dissertation, Universitätsverlag Karlsruhe, Deutschland.

Treutter, D., Wang, D., Farag, M. A., Baires, G. D., Ruhmann, S., Neumuller, M., 2012. Diversity of phenolic profiles in the fruit skin of *Prunus domestica* plums and related species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 12011-12019.

Tseng, S., Abramzon, N., Jackson, J. O., Lin, W. J., 2012. Gas discharge plasmas are effective in inactivating *Bacillus* and *Clostridium* spores. Applied Microbiology and Biotechnology, 93, 2563-2570.

Usenik, V., Kastelec, D., Veberic, R., Štampar, F., 2008. Quality changes during ripening of plums (*Prunus domestica* L.). Food Chemistry, 111, 830-836.

Vandamme, M., Robert, E., Pesnel, S., Barbosa, E., Dozias, S., Sobilo, J., Pouvesle, J. M., 2010. Antitumor effect of plasma treatment on U87 glioma xenografts: preliminary results. Plasma Processes and Polymers, 7, 264-273.

Van Leeuwen, G., Van Kesteren, H., 1998. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia spp.*) on the basis of quantitative characteristics. Canadian Journal of Botany, 76, 2042-2050.

Van Leeuwen, G., Baayen, R., Jeger, M., 2001. Pest risk assessment for the countries of the European Union (as PRA area) on *Monilinia fructicola*. EPPO Bulletin, 31, 481-487.

Veltman, R. H., Sanders, M. G., Persijn, S. T., Pemppelenbos, H. W., Oosterhaven, J., 1999. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). Physiologia Plantarum, 107, 39-45.

Villarino, M., Sandín-Espana, P., Melgarejo, P., De Cal, A., 2011. High chlorogenic and neochlorogenic acid levels in immature peaches reduce *Monilinia laxa* infection by interfering with fungal melanin biosynthesis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 3205-3213.

Villarino, M., Larena, I., Martinez, F., Melgarejo, P., De Cal, A., 2012. Analysis of genetic diversity in *Monilinia fructicola* from the Ebro Valley in Spain using ISSR and RAPD markers. European Journal of Plant Pathology, 132, 511-524.

Vollkommer, F., Hitzschke, L., 1994. Verfahren zum Betreiben einer inkohärent emittierenden Strahlungsquelle. Patent Nr. WO94/23442, https://patentimages.storage.googleapis.com /pdfs/.../EP0733266B1.pdf (Stand: 17.11.2015).

Wang, H., Cao, G., Prior, R. L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 701-705.

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

Webster, J., Weber, R., 2007. Introduction to Fungi. 3rd Edition, University Press, Cambridge UK.

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

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

Willetts, H. J., Harada, Y., 1984. A review of apothecial production by *Monilinia* fungi in Japan. Mycologia, 76, 314-325.

Winter, F., Link, H., 2002. Lucas' Anleitung zum Obstbau. 32. Auflage, Ulmer-Verlag, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland.

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

Xiong, Z., Lu, X., Feng, A., Pan, Y., Ostrikov, K., 2010. Highly effective fungal inactivation in He + O_2 atmospheric-pressure nonequilibrium plasmas. Physics of Plasmas, 17, 123502.

Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P. J., Keener, K. M., Bourke, P., 2014. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. Food Microbiology, 42, 109-116.

6. Anhang

6.1 Rezepturen der Medien

Alle Medien und Lösungen wurden soweit nicht abweichend angegeben mit aqua dest. hergestellt und zur Sterilisation 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

6.1.1 Kartoffel-Dextrose-Agar

Nach Herstellerangaben: 3,9 % w/v PDA

6.1.2 Kartoffel-Dextrose-Bouillon

Nach Herstellerangaben: 2,65 % w/v PDB

6.1.3 Aprikosenagar

Nach Tamm und Fluckiger (1993):

8 % w/v	Aprikosenmark
2 % w/v	Agar-Agar
0,2 % w/v	Hefeextrakt
0,14 mM	Streptomycin-Sulfat

Zugabe von Streptomycin-Sulfat nach dem Autoklaviervorgang.

6.1.4 Ringerlösung

Modifiziert nach B. Braun, Melsungen, Deutschland:

0,86 % w/v	NaCl
0,03 % w/v	KCl
0,033 % w/v	CaCl
0,1 % v/v	Tween 20

6.1.5 Einfriermedium für Konidien

Nach Wirsel *et al.* (2001):

20 % v/v	Glycerin
10 % w/v	Glukose
1 % w/v	Hefeextrakt
0,5 w/v	Casein-Hydrolysat

6.1.6 Einfriermedium für Myzel

Nach Marquenie *et al.* (2003): 25 % v/v Gylcerin in aqua dest.

6.1.7 Zuckerlösung zur Vorinkubation der Sporen

Nach Benito *et al.* (1998):

25 mM	Glukose
10 mM	KH_2PO_4

Einstellung der Lösung auf pH6 durch Zugabe von 6 molarer HCl.

6.2 Detaillierte Statistik

6.2.1 Wärmeeffekt

Tabelle 8. Wärmeeffekt auf den Myzeldurchmesser einer *M. laxa* Kultur.

Statistische Auswertung mit ANOVA, Signifikanzniveau α = 5 %. Die Mittelwerte der geprüften Varianten sind nicht signifikant verschieden.

Temp. [°C]	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz Bonferroni
20	18	2,9431	0,6397	2,6249	3,2612	a
30	17	2,9529	0,7434	2,5707	3,3352	a
40	18	2,9611	0,6365	2,6446	3,2776	a
50	18	2,7403	0,4803	2,5014	2,9791	a

p = 0,677

Tabelle 9. Wärmeeffekt auf die KbE aus einer Myzelsuspension von *M. laxa*.

Statistische Auswertung mit ANOVA, Signifikanzniveau α = 5 %. Die Mittelwerte der geprüften Varianten sind nicht signifikant verschieden.

Temp. [°C]	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz Tukey-HSD
20	12	310,8333	138,5567	222,7986	398,8681	a
30	12	300,2500	125,3976	220,5761	379,9239	a
40	12	325,0833	136,0344	238,6512	411,5155	a
50	12	280,2500	143,7024	188,9458	371,5542	a

p = 0,874

6.2.2 Plasmabehandlung von Myzel

Tabelle 10. Vorversuch Plasmabehandlung von Myzel.

In verschiedenen Verdünnungen (VF: Verdünnungsfaktor), 5 Minuten Behandlungsdauer. Statistische Auswertung der Daten je Verdünnung durch Vergleich der Varianten Kontrolle und Plasma mit zweiseitigem T-Test für 2 unabhängige Stichproben (plasmabehandelt und unbehandelte Kontrolle), Signifikanzniveau α = 5 %.

VF	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
1	Kontrolle	25	3,4240	0,6444	3,1580	3,6900	a
	Plasma	26	2,2904	0,9396	1,9109	2,6699	b
0,5	Kontrolle	20	3,1600	0,3424	2,9997	3,3203	a
	Plasma	20	2,2950	0,3103	2,1498	2,4402	b
0,2	Kontrolle	20	2,7025	0,7730	2,3407	3,0643	a
	Plasma	20	1,8000	0,3009	1,6592	1,9408	b

p = 0,000

Tabelle 11. Plasmabehandlung von Myzel, Zeitreihe.

Statistische Auswertung mit ANOVA und Welch Test, Signifikanzniveau α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Games-Howell und LSD-Bonferroni wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Behandlungsdauer [Min]	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games- H.	Signifikanz Games-H.	MW-GD Bonferroni	Signifikanz Bonferroni
0,0	21	209,6190	83,6430	171,5452	247,6929	152,2573	a	151,0975	a
2,5	15	183,2667	79,0781	139,4747	227,0587	125,9049	ab	124,7451	ab
5,0	21	105,7143	66,3484	75,5128	135,9157	48,3525	c	47,1928	c
7,5	15	41,9333	25,6779	27,7134	56,1533	-15,4285	d	-16,5882	d
10,0	21	14,5714	16,0392	7,2705	21,8724	-42,7904	e	-43,9501	e

mittlere GD Games Howell: 57,3618

mittlere GD Bonferroni: 58,5215

6.2.3 Plasmabehandlung von Sporen

Tabelle 12. Plasmabehandlung von Sporen, 5 Minuten Behandlungsdauer.

Statistische Auswertung mit zweiseitigem T-Test für 2 unabhängige Stichproben (0 und 5 Minuten), Signifikanzniveau α = 5 %.

Behandlungsdauer [Min]	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
0,0	22	155,2174	127,4534	100,1024	210,3324	a
5,0	24	157,8696	109,3087	110,6009	205,1382	a

p = 0,940

Tabelle 13. Plasmabehandlung von Sporen, Zeitreihe.

Statistische Auswertung mit ANOVA, Signifikanzniveau α = 5 %. Die Mittelwerte der geprüften Varianten sind nicht signifikant verschieden.

Behandlungsdauer [Min]	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
0	11	176,0909	94,4632	112,6297	239,5521	a
2,5	11	213,0909	113,2470	137,0105	289,1713	a
5	12	246,7500	136,7221	159,8809	333,6191	a
7,5	12	226,0000	147,1826	132,4846	319,5154	a
10	12	179,2500	122,4835	101,4277	257,0723	a

p = 0,599

6.2.4 Plasmabehandlung künstlich inokulierter Zwetschgen

Tabelle 14. Mittlerer Läsionsdurchmesser in cm künstlich inokulierter Früchte.

Nach 5 und 10 Minuten Plasmabehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Statistische Auswertung mit ANOVA, Signifikanzniveau α = 5 %. Die Mittelwerte der geprüften Varianten sind nicht signifikant verschieden.

Variante	n	MW	Stdabw	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Kontrolle	25	2,8640	0,6701	2,5874	3,1406	a
5 Minuten	15	2,6200	0,5140	2,3353	2,9047	a
10 Minuten	15	2,4967	0,5263	2,2052	2,7881	a

p = 0,150

6.2.5 Fruchtqualität

Tabelle 15. Mittlere Farbwerte plasmabehandelter Früchte der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Statistische Auswertung mit ANOVA, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Tukey-HSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games-H.	Signifikanz Games-H.
Hanita 1	Ernte	6	350,0034	2,6924	347,1779	352,8288	336,3138	ab
	Ausl.	6	353,2441	4,4230	348,6025	357,8857	339,5545	a
	Plasma	6	339,1439	8,1117	330,6312	347,6567	325,4544	b
	Kontrolle	6	336,7881	11,2875	324,9425	348,6336	323,0985	b

mittlere GD Games-Howell: 13,6896

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Hanita 2	Ernte	6	350,0034	2,6924	347,1779	352,8288	a
	Ausl.	6	352,6149	2,6107	349,8751	355,3546	a
	Plasma	6	347,7163	2,1194	345,4921	349,9405	a
	Kontrolle	6	348,7323	6,0078	342,4275	355,0371	a

p = 0,151

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Tukey-HSD	Signifikanz Tukey-HSD
Haus-zwetschge	Ernte	6	350,0034	2,6924	347,1779	352,8288	344,5825	b
	Plasma	6	360,3481	4,1592	355,9833	364,7129	354,9273	a
	Kontrolle	6	357,9364	3,8277	353,9195	361,9533	352,5156	a

mittlere GD Tukey-HSD: 5,4208

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Katinka	Ernte	6	348,5140	4,3662	337,6677	359,3603	a
	Plasma	6	351,5789	2,9698	344,2014	358,9563	a
	Kontrolle	6	354,8420	0,8390	352,7577	356,9263	a

p = 0,116

Tabelle 16. Mittlere Farbwerte plasmabehandelter Früchte aus dem Kontrollversuch verschiedener Varianten (1-9).

Statistische Auswertung mit ANOVA, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Tukey-HSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Variante	n	MW	Stdabw	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Tukey-HSD	Signifikanz Tukey-HSD
1	3	350,0034	3,0102	342,5257	357,4810	336,6879	abc
2	3	339,4166	1,9131	334,6641	344,1690	326,1011	c
3	3	358,7759	3,5621	349,9271	367,6248	345,4604	a
4	3	347,7086	7,1389	329,9746	365,4427	334,3931	abc
5	3	339,2698	4,3651	328,4262	350,1134	325,9543	c
6	3	347,6598	5,8041	333,2417	362,0779	334,3443	abc
7	3	341,4908	4,9252	329,2559	353,7257	328,1753	bc
8	3	350,8446	5,5673	337,0147	364,6744	337,5291	abc
9	3	354,7272	3,2552	346,6408	362,8136	341,4117	ab

Mittlere GD Tukey-HSD = 13,3155

Tabelle 17. Mittlere Festigkeit plasmabehandelter Früchte der Sorten Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Statistische Auswertung mit ANOVA und Welch-Test, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Games-Howell und Bonferroni-LSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Sorte	Variante	n	MW	Stabw	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games-H.	Signifikanz Games-H.
Hanita 1	Ernte	45	1,8004	0,2352	1,7298	1,8711	1,6996	a
	Ausl.	45	1,5749	0,2188	1,5091	1,6406	1,4740	b
	Plasma	66	1,3323	0,1429	1,2971	1,3674	1,2314	c
	Kontrolle	62	1,2973	0,1626	1,2560	1,3385	1,1964	c

mittlere GD Games-Howell = 0,1009

Sorte	Variante	n	MW	Stabw	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games-H.	Signifikanz Games-H.
Hanita 2	Ernte	90	1,8004	0,2339	1,7515	1,8494	1,7284	a
	Ausl.	90	1,4920	0,1789	1,4545	1,5295	1,4199	b
	Plasma	90	1,2564	0,1667	1,2215	1,2914	1,1844	d
	Kontrolle	88	1,3336	0,1586	1,3000	1,3672	1,2615	c

mittlere GD Games-Howell = 0,0720

Sorte	Variante	n	MW	Stabw	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games-H.	Signifikanz Games-H.
Haus-zwetschge	Ernte	92	1,7951	0,2342	1,7466	1,8436	1,7345	a
	Plasma	90	1,6560	0,1339	1,6279	1,6841	1,5954	b
	Kontrolle	90	1,6721	0,1372	1,6434	1,7008	1,6115	b

mittlere GD Games-Howell = 0,0605

Sorte	Variante	n	MW	Stabw	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Bonferroni	Signifikanz Bonferroni
Katinka	Ernte	60	1,6655	0,1579	1,6247	1,7063	1,6037	a
	Plasma	90	1,5599	0,1647	1,5254	1,5944	1,4981	b
	Kontrolle	90	1,5533	0,1645	1,5189	1,5878	1,4915	b

mittlere GD Bonferroni = 0,0618

Tabelle 18. Mittlere Festigkeit plasmabehandelter Früchte aus dem Kontrollversuch verschiedener Varianten (1-9).

Statistische Auswertung mit ANOVA und Welch-Test, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Games-Howell wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games-H.	Signifikanz Games-H.
1	45	1,8004	0,2352	1,7298	1,8711	1,6057	a
2	21	1,3905	0,2164	1,2920	1,4890	1,1958	b
3	21	1,2862	0,1472	1,2192	1,3532	1,0915	b
4	21	1,3233	0,2155	1,2253	1,4214	1,1286	b
5	21	1,3319	0,1741	1,2527	1,4111	1,1372	b
6	21	1,3286	0,1294	1,2697	1,3875	1,1339	b
7	21	1,2562	0,2238	1,1543	1,3581	1,0615	b
8	21	1,3276	0,2232	1,2260	1,4292	1,1329	b
9	21	1,3362	0,2218	1,2352	1,4372	1,1415	b

mittlere GD Games Howell = 0,1946

Tabelle 19. Mittlerer Säuregehalt plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Statistische Auswertung mit ANOVA und Welch-Test, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Games-Howell und Tukey-HSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games-H.	Signifikanz Games-H.
Hanita 1	Ernte	6	23,9333	0,5955	23,3084	24,5583	21,6883	a
	Ausl.	6	23,3000	0,6197	22,6497	23,9503	21,0550	a
	Plasma	6	19,2000	2,1927	16,8989	21,5011	16,9550	b
	Kontrolle	6	19,6500	0,8385	18,7701	20,5299	17,4050	b

mittlere GD Games Howell = 2,2450

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Tukey-HSD	Signifikanz Tukey-HSD
Hanita 2	Ernte	6	23,9333	0,5955	23,3084	24,5583	22,8613	a
	Ausl.	6	17,6667	0,6593	16,9748	18,3586	16,5947	b
	Plasma	6	16,2000	0,5177	15,6567	16,7433	15,1280	c
	Kontrolle	6	16,9500	0,8385	16,0701	17,8299	15,8780	bc

mittlere GD Tukey-HSD = 1,0720

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Tukey-HSD	Signifikanz Tukey-HSD
Haus-zwetschge	Ernte	6	14,9667	0,8066	14,1202	15,8132	13,7820	a
	Plasma	6	10,1000	0,9252	9,1291	11,0709	8,9153	b
	Kontrolle	6	11,1833	0,6047	10,5487	11,8179	9,9986	b

mittlere GD Tukey-HSD = 1,1847

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Tukey-HSD	Signifikanz Tukey-HSD
Katinka	Ernte	3	8,8333	0,3512	7,9609	9,7057	8,0194	a
	Plasma	3	8,3000	0,2646	7,6428	8,9572	7,4861	a
	Kontrolle	3	8,0667	0,3512	7,1943	8,9391	7,2527	a

mittlere GD Tukey-HSD =7,5861
p = 0,067

Tabelle 20. Mittlerer Säuregehalt plasmabehandelter Früchte aus dem Kontrollversuch verschiedener Varianten (1-9).

Statistische Auswertung mit ANOVA, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Tukey-HSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Tukey-HSD	Signifikanz Tukey-HSD
1	3	23,9333	0,6658	22,2793	25,5874	21,8391	a
2	3	14,0667	0,4509	12,9465	15,1868	11,9725	c
3	3	15,4500	1,2500	12,3448	18,5552	13,3558	ab
4	3	15,3000	0,1732	14,8697	15,7303	13,2058	ab
5	3	15,9667	0,9609	13,5797	18,3537	13,8725	ab
6	3	16,4667	0,8083	14,4588	18,4746	14,3725	a
7	3	14,1000	0,3606	13,2043	14,9957	12,0058	b
8	3	13,9333	0,9292	11,6252	16,2415	11,8391	b
9	3	14,8333	0,1155	14,5465	15,1202	12,7391	ab

GD Tukey-HSD = 2,0941

Tabelle 21. Mittlerer Zuckergehalt plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita, Hauszwetschge und Katinka.

Statistische Auswertung mit ANOVA und Welch-Test, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Games-Howell und Tukey-HSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Hanita 1	Ernte	6	16,2667	1,2078	14,9992	17,5341	a
	Ausl.	6	16,0000	0,3225	15,6616	16,3384	a
	Plasma	6	16,5167	0,3869	16,1107	16,9227	a
	Kontrolle	6	16,3667	0,4546	15,8896	16,8437	a

p = 0,628

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Hanita 2	Ernte	6	16,2667	1,2078	14,9992	17,5341	a
	Ausl.	6	16,0333	0,2733	15,7466	16,3201	a
	Plasma	6	16,4000	0,5621	15,8101	16,9899	a
	Kontrolle	6	16,3000	0,5254	15,7487	16,8513	a

p = 0,845

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Haus-zwetschge	Ernte	6	17,1000	0,2366	16,8517	17,3483	a
	Plasma	6	17,2500	0,3564	16,8760	17,6240	a
	Kontrolle	6	17,1167	0,5811	16,5068	17,7265	a

p = 0,794

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Katinka	Ernte	3	15,8667	0,1155	15,5798	16,1535	a
	Plasma	3	15,5667	0,2887	14,8496	16,2838	a
	Kontrolle	3	15,8667	0,2082	15,3496	16,3838	a

p = 0,226

Tabelle 22. Mittlerer Zuckergehalt plasmabehandelter Früchte aus dem Kontrollversuch verschiedener Varianten (1-9).

Statistische Auswertung mit ANOVA, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Tukey-HSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Tukey-HSD	Signifikanz Tukey-HSD
1	3	16,2667	1,3503	12,9123	19,6210	13,4010	b
2	3	16,6333	0,6506	15,0171	18,2496	13,7677	b
3	3	19,8000	2,0664	14,6668	24,9332	16,9343	a
4	3	17,8333	0,8083	15,8254	19,8412	14,9677	ab
5	3	17,0667	0,2309	16,4930	17,6404	14,2010	ab
6	3	18,2000	1,1000	15,4674	20,9326	15,3343	ab
7	3	18,4667	0,3055	17,7078	19,2256	15,6010	ab
8	3	17,8333	0,6110	16,3155	19,3512	14,9677	ab
9	3	17,2000	0,3606	16,3043	18,0957	14,3343	ab

Mittlere GD Tukey-HSD = 2,8657

Tabelle 23. Mittlerer Gehalt an Vitamin C plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita und Hauszwetschge.

Statistische Auswertung mit ANOVA und Welch-Test, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Games-Howell und Tukey-HSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Hanita	Ernte	9	1,7011	0,5632	1,2682	2,1341	a
	Plasma	9	1,5159	0,4797	1,1471	1,8846	a
	Kontrolle	6	1,8575	0,4662	1,3682	2,3468	a

p = 0,449

Sorte	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Tukey-HSD	Signifikanz
Haus-zwetschge	Ernte	3	2,0570	0,5141	0,7800	3,3340	1,4540	a
	Plasma	6	1,0374	0,1921	0,8359	1,2390	0,4345	b
	Kontrolle	6	1,1605	0,3682	0,7741	1,5470	0,5576	b

Mittlere GD Tukey-HSD = 0,6029

p = 0,003

Tabelle 24. Mittlerer Gehalt an Hydroxyzimtsäuren (HCA, Nr. 1-5) plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita.

Statistische Auswertung mit ANOVA, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Bonferroni-LSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Bonferroni	Signifikanz Bonferroni
HCA 1	Ernte	3	0,0382	0,0015	0,0345	0,0420	0,0322	a
	Plasma	9	0,0243	0,0034	0,0217	0,0269	0,0182	b
	Kontrolle	9	0,0232	0,0046	0,0197	0,0268	0,0172	b

mittlere GD Bonferroni-LSD = 0,0061

p = 0,000

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
HCA 2	Ernte	3	0,0132	0,0006	0,0118	0,0145	a
	Plasma	9	0,0114	0,0019	0,0099	0,0128	a
	Kontrolle	9	0,0116	0,0011	0,0108	0,0125	a

p = 0,200

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Bonferroni	Signifikanz Bonferroni
HCA 3	Ernte	3	0,1455	0,0150	0,1083	0,1827	0,1297	a
	Plasma	9	0,1344	0,0081	0,1281	0,1406	0,1185	ab
	Kontrolle	9	0,1276	0,0101	0,1198	0,1354	0,1117	b

mittlere GD Bonferroni-LSD = 0,0159

p = 0,043

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
HCA 4	Ernte	3	0,0214	0,0061	0,0063	0,0364	a
	Plasma	9	0,0201	0,0022	0,0184	0,0218	a
	Kontrolle	9	0,0184	0,0020	0,0169	0,0199	a

p = 0,240

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
HCA 5	Ernte	3	0,0267	0,0018	0,0223	0,0311	a
	Plasma	9	0,0270	0,0025	0,0251	0,0290	a
	Kontrolle	9	0,0252	0,0033	0,0227	0,0278	a

p = 0,404

Tabelle 25. Mittlerer Gehalt an Hydroxyzimtsäuren (HCA, Nr. 6-9) plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita.

Statistische Auswertung mit ANOVA und Welch-Test, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Games-Howell wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
HCA 6	Ernte	3	0,0174	0,0054	0,0039	0,0308	a
	Plasma	9	0,0146	0,0016	0,0133	0,0158	a
	Kontrolle	9	0,0141	0,0017	0,0127	0,0154	a

p = 0,140

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
HCA 7	Ernte	3	0,0226	0,0037	0,0133	0,0319	a
	Plasma	9	0,0214	0,0042	0,0181	0,0246	a
	Kontrolle	9	0,0218	0,0031	0,0195	0,0242	a

p = 0,876

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games-H.	Signifikanz Games-H.
HCA 8	Ernte	3	0,0062	0,0002	0,0057	0,0066	0,0053	a
	Plasma	9	0,0055	0,0006	0,0051	0,0060	0,0047	b
	Kontrolle	9	0,0049	0,0010	0,0041	0,0057	0,0040	b

mittlere GD Games Howell = 0,0009

p (Welch Test) = 0,004

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
HCA 8-1	Ernte	3	0,0187	0,0039	0,0089	0,0284	a
	Plasma	9	0,0187	0,0022	0,0170	0,0205	a
	Kontrolle	9	0,0178	0,0032	0,0153	0,0203	a

p = 0,786

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
HCA 9	Ernte	3	0,0142	0,0024	0,0082	0,0203	a
	Plasma	9	0,0182	0,0023	0,0164	0,0200	a
	Kontrolle	9	0,0172	0,0026	0,0151	0,0192	a

p = 0,081

Tabelle 26. Mittlerer Gehalt an spezifischen Hydroxyzimtsäuren, Flavonen und Flavonolen plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita.

Statistische Auswertung mit ANOVA, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Bonferroni-LSD wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Bonferroni	Signifikanz Bonferroni
3-p-Cumaroayl-chinasäure	Ernte	3	0,0162	0,0021	0,0110	0,0214	0,0133	a
	Plasma	9	0,0130	0,0019	0,0115	0,0145	0,0102	b
	Kontrolle	9	0,0122	0,0016	0,0110	0,0134	0,0094	b

mittlere GD Bonferroni-LSD = 0,0029

p = 0,013

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Feruoyl-chinasäure	Ernte	3	0,0480	0,0067	0,0314	0,0646	a
	Plasma	9	0,0457	0,0039	0,0428	0,0487	a
	Kontrolle	9	0,0434	0,0046	0,0399	0,0469	a

p = 0,297

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Flavon	Ernte	3	0,0582	0,0054	0,0446	0,0717	a
	Plasma	9	0,0577	0,0054	0,0535	0,0618	a
	Kontrolle	9	0,0560	0,0056	0,0517	0,0603	a

p = 0,753

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Flavonol	Ernte	3	0,0481	0,0150	0,0108	0,0853	a
	Plasma	9	0,0539	0,0076	0,0481	0,0597	a
	Kontrolle	9	0,0535	0,0107	0,0453	0,0617	a

p = 0,670

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
n-Chlorogen-säure	Ernte	3	0,1851	0,0442	0,0753	0,2949	a
	Plasma	9	0,1922	0,0244	0,1734	0,2109	a
	Kontrolle	9	0,1810	0,0210	0,1648	0,1971	a

p = 0,662

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Neo-chlorogen-säure	Ernte	3	1,5102	0,1417	1,1582	1,8623	a
	Plasma	9	1,4208	0,1002	1,3438	1,4978	a
	Kontrolle	9	1,3833	0,1384	1,2769	1,4897	a

p = 0,325

Tabelle 27. Mittlerer Gehalt unbekannter phenolischer Verbindungen in plasmabehandelten Früchten der Sorte Hanita.

Statistische Auswertung mit ANOVA, α = 5 %. Die Mittelwerte sind nicht signifikant verschieden.

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Unknown 1	Ernte	3	0,0094	0,0050	-0,0030	0,0218	a
	Plasma	9	0,0134	0,0022	0,0118	0,0151	a
	Kontrolle	9	0,0109	0,0033	0,0084	0,0134	a

p = 0,110

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Unknown 2	Ernte	3	0,0220	0,0048	0,0100	0,0339	a
	Plasma	9	0,0219	0,0019	0,0204	0,0233	a
	Kontrolle	9	0,0205	0,0033	0,0180	0,0231	a

p = 0,599

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Unknown 3	Ernte	3	0,0363	0,0034	0,0279	0,0447	a
	Plasma	9	0,0371	0,0027	0,0350	0,0391	a
	Kontrolle	9	0,0343	0,0036	0,0316	0,0371	a

p = 0,209

Tabelle 28. Mittlerer Anthocyan-Gehalt plasmabehandelter Früchte der Sorte Hanita.

Statistische Auswertung mit ANOVA, α = 5 %. Die Mittelwerte sind nicht signifikant verschieden.

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Cyanidin 3-glukosid	Ernte	3	0,1839	0,0521	0,0546	0,3133	a
	Plasma	9	0,2208	0,0389	0,1909	0,2507	a
	Kontrolle	9	0,2399	0,0616	0,1925	0,2873	a

p = 0,284

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Cyanidin 3-rutinosid	Ernte	3	1,2667	0,2280	0,7004	1,8331	a
	Plasma	9	1,3474	0,1312	1,2465	1,4482	a
	Kontrolle	9	1,3873	0,2938	1,1614	1,6131	a

p = 0,730

Polyphenol	Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	Signifikanz
Päonidin 3-rutinosid	Ernte	3	0,2051	0,0180	0,1603	0,2499	a
	Plasma	9	0,2214	0,0394	0,1911	0,2516	a
	Kontrolle	9	0,2103	0,0422	0,1779	0,2428	a

p = 0,760

6.2.6 Plasmacharakterisierung

Tabelle 29. Charakterisierung der Wirkmechanismen einer Plasmabehandlung.

Dargestellt sind Mittelwerte der KbE. Statistische Auswertung mit ANOVA und Welch-Test, α = 5 %. Durch Mehrfachvergleiche der Mittelwerte nach Games-Howell wurden die Signifikanzen ermittelt. Mittelwerte, die mit verschiedenen Buchstaben versehen sind, unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

Variante	n	MW	Stdabw.	Untergrenze	Obergrenze	MW-GD Games-H.	Signifikanz Games-H.
Kontrolle	16	154,7500	82,4641	110,8080	198,6920	111,2470	a
UV	16	67,2500	31,4102	50,5127	83,9873	23,7470	b
Plasma	16	6,3125	8,2601	1,9110	10,7140	-37,1905	c

mittlere GD Games Howell: 43,50

6.3 Künstliche Inokulation und Plasmabehandlung von Zwetschgen

Abbildung 41. 5-minütige Plasmabehandlung von *M. laxa* auf Zwetschge.

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

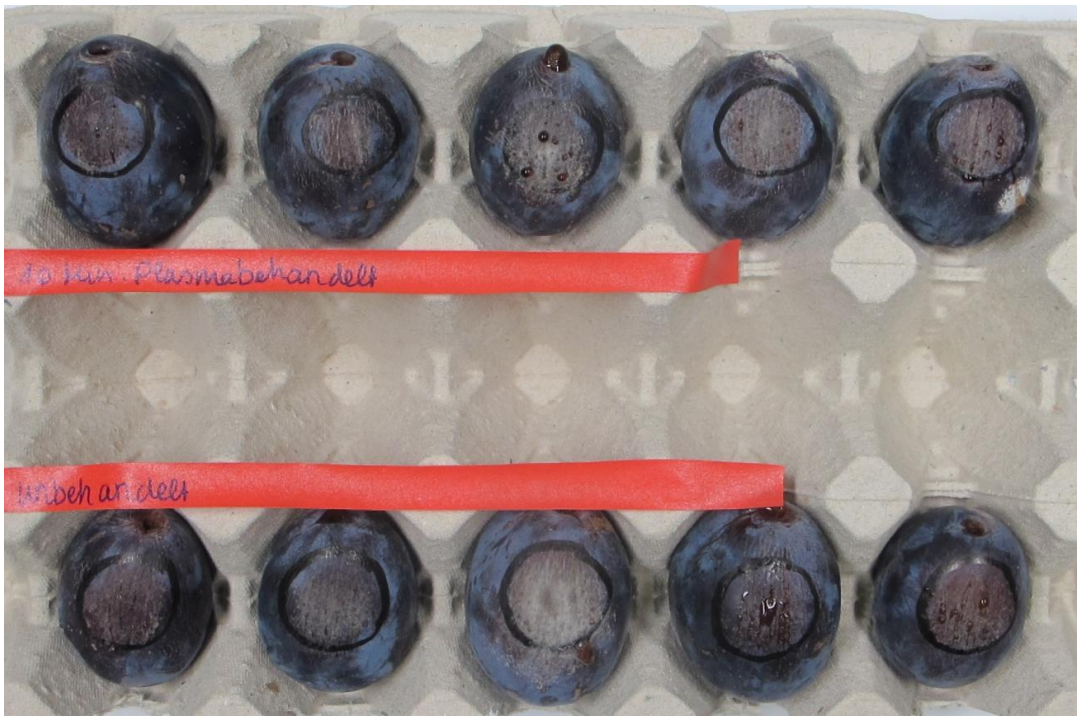

Abbildung 42. 10-minütige Plasmabehandlung von *M. laxa* auf Zwetschge.

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

Danksagung

Für die zahlreiche Unterstützung und Beratung während der Arbeiten zu meiner Dissertation bin ich sehr dankbar.

Besonders bedanken möchte ich deshalb bei Prof. Dr. Ralf T. Vögele der Fachgruppe Phytopathologie der Universität Hohenheim für die Betreuung der Arbeit und die fachliche Unterstützung sowie das immer unmittelbare Zurverfügungstehen. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Jens N. Wünsche für die Übernahme der Zweitkorrektur und die hilfreichen Anregungen im Vorfeld. Gleichermaßen danken möchte ich dem Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee und seinem Geschäftsführer Dr. Manfred Büchele für die Finanzierung und Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die Offenheit gegenüber neuen Ideen in der Agrarwissenschaft. Nicht weniger zu Dank verpflichtet bin ich dem Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie an der Universität Stuttgart und seinem Leiter Dr. Matthias Walker für die Bereitstellung der Plasmatechnik und der notwendigen Materialien. Der Arbeitsgruppe Pflanzenschutz des KOB danke ich für die Bereitstellung der Laboreinrichtung und -materialien. Ein herzlicher Dank geht an die Arbeitsgruppe für Lagerung und Nacherntephysiologie des KOB für die umfangreiche Unterstützung bei der Fruchtlagerung und der Durchführung der Fruchtqualitätsanalysen. Vielmals bedanken möchte ich mich ebenso bei Prof. Dr. Dieter Treutter und seinem Team der Fachgruppe Obstbau am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München für die Unterstützung bei der Durchführung der Polyphenolanalysen und die Bereitstellung der notwendigen Materialien und Gerätschaften.

Zudem möchte ich im Besonderen den folgenden Personen danken, die durch ihren Beitrag und ihre Unterstützung wesentlich am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren:

Dr. Andreas Schulz und Dr. Martina Leins für ihre Unterstützung in allen Phasen der Doktorarbeit und für die gute Zusammenarbeit. Prof. Dr. Dominikus Kittemann und Dr. Daniel Neuwald möchte ich für ihre Hilfe in allen Fragen der Nachernte und für die Unterstützung bei der Versuchsplanung und -durchführung danken. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Kittemann, dass er sich als 3. Prüfer zur Verfügung gestellt hat. Ein großer Dank für die Unterstützung im Labor geht an Renate Wirsing, Sabine Sonnentag und Berenice Vollmar. Vielen Dank auch an Thomas Kininger für den guten Kontakt zum Außenbetrieb und die Unterstützung während der Zwetschgenernte. Für die Hilfe und Beratung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danke ich Andreas Riehle, Dr. Lars Lehmberg, Telse Zimmermann und Martin Fütterer.

Finanziert wurde dieses Projekt durch das Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee sowie durch das Forschungsprogramm KLIMOPASS aus Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg.