

Vergleichende Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Chitosanen in Relation zu ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

Dem Promotionsausschuss des Fachbereichs Biologie/Chemie der
Universität Bremen vorgelegt am 20. Januar 2016 von
Dipl. Biol. Nadia Keddig

Komitee:

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Heyser
2. Gutachter: Prof. Dr. Gunter Otto Kirst
1. Prüfer: Prof. Dr. Martin Diekmann
2. Prüfer: Dr. Werner Wosniok



Erklärung nach § 6 Abschnitt 5 der Promotionsordnung der Universität Bremen für die mathematischen, natur- und ingenieurwissenschaftlichen Fachbereiche vom 14. März 2007

Hiermit erkläre ich, Nadia Keddig, dass ich die vorliegende Doktorarbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

*- das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile -
verkürztes Zitat nach Aristoteles*

Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich in dieser herausfordernden, aber auch ungemein lohnenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinen Professoren, Gutachtern und Prüfern verpflichtet. Allen voran möchte ich meinem Professor und Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Heyser für seine wertvolle Hilfe und Unterstützung herzlich danken. Er hat mich mit seinem unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen stets in neue Sphären gelenkt und stand mir mit seinem großen Fachwissen zur Seite. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte sowie für die von ihm geschaffene offene Arbeitsatmosphäre und ständige Anregung zur interdisziplinäre Gemeinschaft. In Zusammenarbeit mit unterschiedlichen Arbeitsgruppen innerhalb und außerhalb des UFTs konnte ich weite Teile meiner Arbeiten durchführen, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ein herzlicher Dank gebührt auch meinem zweiten Gutachter Prof. Dr. Gunter Kirst. Er war einer sachlichen Diskussion gegenüber immer offen und gerne denke ich an die intensiven Beratungsgespräche zurück, die ich als Beisitzer im Rahmen zahlreicher Vordiplomprüfungen mit ihm führen durfte.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem ersten Prüfer Prof. Dr. Martin Diekmann, der mir in meiner gesamten Studienzeit immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand und es versteht, Probleme an der Wurzel zu packen.

Ich danke nicht zuletzt vielmals meinem zweiten Prüfer Dr. Werner Wosniok für die wertvolle langjährige Zusammenarbeit. Unermüdlich haben wir gemeinsam die Ergebnisse biologisch wie statistisch auseinandergenommen, R auf sein ganzes Potential geprüft und Programm um Programm für die Auswertung verfasst.

Neben den Mitgliedern meiner eigenen Arbeitsgruppe, denen mein ausdrücklicher Dank gilt, möchte ich mich auch noch bei dem AK Chitosan, der AG Filser, der AG Jasdorff, der AG Koenig, der AG Rübiger und der AG Thörming sowie bei dem Ausbildungszentrum für Laboranten der Universität Bremen, dem IFAM und der Materialprüfungsanstalt für ihre Unterstützung danken. Ich durfte bei ihnen einen Teile der Untersuchungen für meine Doktorarbeit durchführen, ihre Geräte benutzen und einzelne Mitglieder wie Jürgen Arning, Ulrike Bottin-Weber, Peter Brackmann, Ina Cording, Ingo Grunwald, Klaudia Hettwer,

Jan Küver, Frank Lubisch, Markko Remesch, Ursula Stoll, Ute Uebers und Mirko Weinhold standen mir besonders mit Rat und Tat zur Seite.

Während der ganzen Zeit waren meine Familie und Freunde für mich da. Sie waren mir ein Rückhalt und haben mir auch in schwierigen Phasen Mut gemacht.

Thorsten danke ich für seine Ausdauer, Ruhe und Geduld, und seine Fähigkeit, mich immer wieder aufzumuntern

Summary

Chitosans are a diverse group of biopolymers, which are widely used in different fields of application for years. They are appreciated and used especially because of their antimicrobial effects combined with their biocompatible properties. However, details of the correlation between their physical-chemical characteristics and biological effects (e.g. antimicrobial effect) have not been fully understood yet.

In the following thesis the antimicrobial properties were examined with mold fungi as well as with gram-positive and gram-negative bacteria. Furthermore, the biocompatibility was proven with a plant assay and the physical-chemical properties of chitosan were systematically investigated.

The results of the investigations on mold fungi and bacteria allow the conclusion that chitosan has no antifungal capacities. Furthermore the mold fungi are able to use the chitosan as carbon resource. Certainly, chitosans operated as an inhibitor to the group of bacteria. They acted biostatical and bactericide, which led to a structural membrane damage of *E. coli*. However, there was no indication of a different effect on gram-positive bacteria compared to gram-negative bacteria. The effect of chitosans is presumably more affected by bacteria and their adaptation to the environment rather than by the composition of the membrane structure. It was shown that the marine gram-negative bacteria *V. fischeri* was less affected in the occurrence of luminescent than the bacteria *E. coli* (gram-negative) and *B. subtilis* (gram-positive) in their dehydrogenase activity. The biocompatibility is guaranteed unrestricted as long as the pH is neutral to alkaline. Chitosans will form micelles or aggregates under these pH conditions, which significantly reduces their bioavailability. Effects in eukaryotic test systems under acetic pH conditions demonstrated, that the chitosan significantly disturbed the growth of the plant *L. minor*. Additionally, no growth recovery was observed even several weeks after the treatment.

No influence of the molecular weight of the Chitosans on inhibition effects could be found for the correlation of the physical-chemical properties with all EC values over all experiments. On the other hand it could be shown that the degree of acetylation (and additionally combined with the amount of acetylated units) and the pattern of acetylation might influence the impact of chitosan on biological effects. A low degree of acetylation or a low-numbered pattern of

acetylation inhibited the growth of bacteria most clearly, whereas a high degree of acetylation or a high-numbered pattern of acetylation inhibited the growth of *L. minor* most effectively. Complete biocompatibility can probably be achieved by adaption of these characteristics of chitosan.

Zusammenfassung

Chitosane stellen eine sehr variable Gruppe von Polymeren dar, die seit Jahren nahezu universell in diversen Anwendungsgebieten eingesetzt werden. Vornehmlich werden sie aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung und ihrer gleichzeitig biokompatiblen Eigenschaften geschätzt und verwendet. Eine genaue Zuordnung der physikalisch-chemischen Parameter der Chitosane zu den jeweiligen Effekten, wie z.B. antimikrobielle Wirkung, war bislang nicht möglich.

In dieser Arbeit wurden die antimikrobiellen Eigenschaften an verschiedenen Schimmelpilzen, sowie grampositiven und gramnegativen Bakterien, untersucht. Außerdem wurde die Biokompatibilität an Pflanzen erforscht und eine systematische Analyse der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Chitosane durchgeführt.

Aus den Untersuchungen an Bakterien und Schimmelpilzen ging hervor, dass keine fungiziden Eigenschaften der Chitosane festgestellt werden konnten. Vielmehr stellte sich heraus, dass die untersuchten Pilze die verwendeten Chitosane als Kohlenstoffquelle verwenden konnten. In der Gruppe der Bakterien erwies sich Chitosan hingegen als sehr effektiv und wirkte sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid, was zur Zerstörung der Membranstruktur von *E. coli* führte. Eine differenzierte Wirkung auf grampositive und gramnegative Bakterien konnte bei direktem Vergleich nicht bestätigt werden. Die Wirkung der Chitosane ist daher nicht auf die Zellwandbeschaffenheit zurückzuführen, sondern scheint eher durch die Bakterien selbst und ihre Anpassung an ihre individuellen Lebensbedingungen bestimmt zu werden. So zeigte sich, dass das marine gramnegative Bakterium *V. fischeri* in seiner Leuchtleistung durch Chitosane weit weniger beeinträchtigt wurde als *E. coli* oder *B. subtilis* in ihrer Dehydrogenaseaktivität. Die Biokompatibilität ist hingegen uneingeschränkt gewährleistet, solange der pH-Wert sich im neutralen oder basischen Bereich befindet. Unter diesen pH-Bedingungen kommt es zur Mizellbildung und Aggregation der Chitosane, so dass ihre Bioverfügbarkeit stark eingeschränkt ist. In Studien zum Einsatz von Chitosanen in eukaryotischer Testsystemen mit niedrigeren pH-Werten (unterhalb des neutralen Bereichs), zeigte sich jedoch, dass es auch dort zu Wachstumsstörungen kommen kann. Das Wachstum von *L. minor* wird empfindlich durch Chitosan beeinträchtigt, welches sich auch nach mehrwöchigen Experimenten nicht wieder normalisiert.

Im Zusammenhang mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften über alle Experimente konnte kein Einfluss des Molekulargewichts auf inhibierende Effekte nachgewiesen werden. In den Korrelationsberechnungen zeigte sich jedoch, dass der Acetylierungsgrad (auch zusammen mit dem Anteil an acetylierten Einheiten) oder das Acetylierungsmuster einen Einfluss haben könnten. Die Bakterien wurden überwiegend durch einen niedrigen Acetylierungsgrad oder ein geringes Acetylierungsmuster inhibiert, wohingegen *L. minor* am stärksten durch Chitosane mit einem hohen Acetylierungsgrad oder Acetylierungsmuster inhibiert wurde. Biokompatibilität kann somit möglicherweise durch Anpassung dieser Parameter uneingeschränkt erzeugt werden.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Danksagung..... | 1 |
| Summary | 3 |
| Zusammenfassung..... | 5 |
| Inhaltsverzeichnis..... | 7 |
| Abkürzungen und Konventionen | 9 |
| 1 Einleitung | 11 |
| 1.1 Strukturelle Unterschiede von Chitin und Chitosan | 12 |
| 1.2 Physikalisch-chemische Parameter natürlicher Polymere | 17 |
| 1.2.1 Molekulargewicht..... | 19 |
| 1.2.2 Polydispersität | 20 |
| 1.2.3 Polymerisationsgrad | 20 |
| 1.2.4 Acetylierungsgrad | 20 |
| 1.2.5 Substitutionsmuster | 21 |
| 1.2.6 Konformation | 21 |
| 1.2.7 Synthetische Chitosane | 22 |
| 1.2.8 pH-Wert..... | 22 |
| 1.3 Natürliche Ressourcen des α - und β -Chitins..... | 23 |
| 1.4 Herstellung von Chitosan aus Chitin | 24 |
| 1.5 Biokompatibilität und Biodegradation von Chitosan | 26 |
| 1.6 Wirkung und wirkungsbezogene Anwendungsgebiete von Chitosan | 27 |
| 1.6.1 Bindungskapazitäten | 28 |
| 1.6.2 Kurative Effekte | 29 |
| 1.7 Interaktion mit Zielorganismen | 29 |
| 1.7.1 Pilze..... | 30 |
| 1.7.2 Bakterien | 32 |
| 1.7.3 Höhere Organismen..... | 35 |
| 1.8 Zielsetzung und Fragestellung..... | 37 |
| 2 Material und Methoden | 39 |
| 2.1 Versuchsdesign | 39 |
| 2.2 Medien und Puffer | 41 |
| 2.3 Chitosane | 42 |
| 2.3.1 Verifizierung der Eigenschaften der Chitosane | 43 |
| 2.3.2 Lagerung und Sterilisation von Chitosanen | 43 |
| 2.3.3 Konzentrierung der Essigsäure..... | 44 |
| 2.3.4 Präparation der Testsubstanzen | 45 |
| 2.3.5 Gaschromatographischer Nachweis der Essigsäurekonzentration | 46 |
| 2.4 Organismen und Zelllinien | 46 |
| 2.4.1 Anzucht der Organismen..... | 47 |
| 2.4.2 Einsatz der Organismen | 48 |
| 2.5 Untersuchung biologischer Effekten verschiedener Chitosane | 49 |
| 2.5.1 Hemmung der Sporenkeimung und des Pilzwachstums | 49 |
| 2.5.2 Inhibition der Koloniebildung von <i>Escherichia coli</i> | 49 |
| 2.5.3 Bakterieller Proliferationsassay mit <i>Escherichia coli</i> | 50 |
| 2.5.4 TEM Aufnahmen dotierter <i>Escherichia coli</i> -Bakterien | 51 |
| 2.5.5 Beeinträchtigung der Dehydrogenaseaktivität von Bakterien..... | 54 |
| 2.5.6 Beeinträchtigung der Lumineszenz bei <i>Vibrio fischeri</i> | 56 |
| 2.5.7 Wachstum der Frondfläche von <i>Lemna minor</i> | 57 |
| 2.5.8 Viabilität der Zelllinie Hep G2 im LDH-Test..... | 58 |
| 2.6 Statistische Auswertung | 59 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 2.6.1 | Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen | 60 |
| 2.6.2 | Konfidenzintervalle | 62 |
| 2.6.3 | Korrelationen..... | 62 |
| 2.6.4 | Lineares Gemischte-Effekte-Modell | 62 |
| 3 | Ergebnisse | 65 |
| 3.1 | Eigenschaften der Chitosane | 65 |
| 3.1.1 | Auswirkungen von Lagerung und Sterilisation..... | 65 |
| 3.1.2 | Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften | 70 |
| 3.2 | Chitosan als Oberflächenbehandlung | 74 |
| 3.2.1 | Chitosan-induzierte Hemmung der Sporenkeimung und des Pilzwachstums.... | 74 |
| 3.2.2 | Inhibition der Koloniebildung von <i>Escherichia coli</i> auf Agaroseplatten | 76 |
| 3.3 | Antibakterielle Wirkung gelöster Chitosane | 76 |
| 3.3.1 | Einfluss auf die Proliferation von <i>Escherichia coli</i> | 77 |
| 3.3.2 | TEM Aufnahmen chitosanbehandelter <i>Escherichia coli</i> Bakterien..... | 83 |
| 3.3.3 | Effekt auf die Dehydrogenaseaktivität von <i>Escherichia coli</i> | 87 |
| 3.3.4 | Effekt auf die Dehydrogenaseaktivität von <i>Bacillus subtilis</i> | 91 |
| 3.3.5 | Beeinträchtigung der Lumineszenz bei <i>Vibrio fischeri</i> | 94 |
| 3.3.6 | Zusammenfassung der Wirksamkeit der Chitosane auf Mikroorganismen | 97 |
| 3.4 | Wirkung gelöster Chitosane auf eukaryotische Testsysteme | 101 |
| 3.4.1 | Einfluss auf die Arealdominanz von <i>Lemna minor</i> | 101 |
| 3.4.2 | Flächenwachstum von <i>Lemna minor</i> im <i>repeat dose</i> Experiment | 105 |
| 3.4.3 | Viabilität der Zelllinie Hep G2 im LDH-Test..... | 110 |
| 4 | Diskussion | 115 |
| 4.1 | Einflussnahme durch physikalisch-chemische Eigenschaften | 115 |
| 4.1.1 | Lagerung als beeinflussender Faktor..... | 117 |
| 4.1.2 | Sterilisation als beeinflussender Faktor..... | 119 |
| 4.1.3 | Einfluss des Schwermetallgehalts der Chitosane | 120 |
| 4.2 | Antimikrobielle Eigenschaften von Chitosanen bei Oberflächenbewuchs | 121 |
| 4.2.1 | Effekte auf Schimmelpilze | 122 |
| 4.2.2 | Effekte auf <i>Escherichia coli</i> | 125 |
| 4.3 | Antibakterielle Wirkung gelöster Chitosane | 127 |
| 4.3.1 | Wirkung auf gramnegative Bakterien | 127 |
| 4.3.2 | Wirkung auf grampositive Bakterien | 143 |
| 4.3.3 | Zusammenfassende Betrachtung der Mikroorganismen | 145 |
| 4.4 | Biokompatibilität gelöster Chitosane | 152 |
| 4.4.1 | Wirkung der Chitosane auf <i>Lemna minor</i> | 152 |
| 4.4.2 | Wirkung von Chitosan auf Hepatozyten unter neutralen pH-Konditionen..... | 159 |
| 4.5 | Antimikrobielle Wirkung versus Biokompatibilität der Chitosane..... | 161 |
| 4.5.1 | Methodische Aspekte | 161 |
| 4.5.2 | Bioverfügbarkeit im biologischen System | 162 |
| 4.5.3 | Vergleichende Wirkung von Chitosanen auf Pro- und Eukaryoten..... | 163 |
| 4.6 | Fazit und Ausblick..... | 165 |
| 5 | Literatur | 167 |
| | Herstellerangaben..... | 181 |
| | Abbildungsverzeichnis | 185 |
| | Tabellenverzeichnis..... | 187 |
| | Anhang | 189 |

Abkürzungen und Konventionen

| | |
|----------------------|--|
| 0.5 | Alle Dezimalzahlen werden in dieser Arbeit nach dem amerikanischen System mit Punkt angegeben |
| 1:2 | Verhältnisangaben entsprechen durchgehend dem chemischen Standard (d.h. ein Verhältnis 1:2 entspricht einem Teil der Komponente A auf insgesamt 2 Teile Gesamtlösung. Somit enthält die Gesamtlösung zusätzlich einen Teil Komponente B) |
| ^{13}C -NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Spektroskopie der Kohlenstoffisotops ^{13}C |
| ^1H -NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Spektroskopie der Wasserstoffisotops ^1H |
| A | acetylierte Einheit, Kurzform bei Angabe der Primärstruktur |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATP | Adenosin-5-triphosphat |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| BMELV | Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz |
| BN | Brown Norway, Inzuchtrattenstamm |
| BVL | Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit |
| C-6 | Kohlenstoffatom an Position 6 (Zahl variiert) |
| CAMHB | <i>cation-adjusted Muller Hinton II broth</i> |
| CFU | <i>colony-forming unit</i> |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CMI | <i>Descriptions of fungi and bacteria</i> |
| COS | Chitosan-Oligosaccharide |
| D | deacetylierte Einheit, Kurzform bei Angabe der Primärstruktur |
| D.E.R. 736 | Dipropyleneglycoldiglycidylether |
| D_A | <i>degree of acetylation</i> |
| DD | <i>degree of de-acetylation</i> |
| DMAE | Dimethylaminoethanol |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| D_p | <i>degree of polymerisation</i> |
| DSM | Enumeration der DSMZ für Mikroorganismen und Medien |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EC_{xx} | <i>Effect concentration</i> (bei einem Effekt von xx %) |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Titriplex III |
| ERL 4206 | Vinylcyclohexendiepoxyd |
| F_A | <i>fraction of acetylation</i> |
| FDA | US Food and Drug Administration |
| FID | Flammen-Ionisations-Detektor |
| GlcN | Glucosamin |
| GlcNAc | N-Acetylglucosamin |
| GPC/SEC | <i>Gel Permeation Chromatography/Size Exclusion Chromatography</i> |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure |
| ID | Innendurchmesser |
| LB-Medium | <i>lysogeny broth</i> -Medium |
| LD_{50} | mittlere letale Dosis (Effekt bei 50 %) |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| <i>L. minor</i> | <i>Lemna minor</i> |
| LOEC | <i>lowest observed effect concentration</i> |
| M | Molar |

| | |
|--------------------|--|
| MDO | membran derived oligosaccharides |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| M-H | Mark-Houwink-Strukturplot |
| MIC | <i>Minimum inhibitory concentration</i> |
| M_N | <i>number averaged molecular weight</i> |
| M_W | <i>weight averaged molecular weight</i> , Molekulargewicht |
| N.A. | <i>not available</i> , nicht verfügbar |
| NADH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid |
| NH ₂ - | Aminogruppe |
| NOEC | <i>no observed effect concentration</i> |
| NSA | Nonenylsuccininanhydrit |
| OD | optische Dichte (gilt als Synonym für die Absorption) |
| OD _x | optische Dichte bei x Nanometern |
| OECD | <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> |
| OM | äußere Membran gram-negativer Bakterien |
| P _A | <i>pattern of acetylation</i> |
| PD | Polydispersität |
| pK-Wert | negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante K |
| pK _a | Säurekonstante |
| R _h | hydrodynamischer Radius |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SL | Stammlösungen |
| TEA | Triethanolaminhydrochlorid |
| TEA | Triethanolaminpuffer |
| Tris | Trizma [®] base |
| UBA | Umweltbundesamt |
| VdW | Verfahrenstechnik der Wertstoffrückgewinnung |
| <i>V. fischeri</i> | <i>Vibrio fischeri</i> (neu klassifiziert als <i>Aliivibrio fischeri</i>) |
| WST-1 Reagenz | 4-[3-(4-Jodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzol-Disulfonat |
| η | intrinsische Viskosität |
| RSD | relative Standardabweichung |
| H ₂ O | Wasser |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| HCl | Salzsäure |
| HAc | Essigsäure |
| x_M | Mittelwert |

1 Einleitung

Chitin ist nach Zellulose das weltweit häufigste, natürlich vorkommende Polymer und dominierend im Exoskelett der Arthropoden [Rudall, 1963]. Chitosan, ein Derivat des Chitins, wurde 1859 durch Rouget entdeckt und fortwährend weiter erforscht [Dodane & Vilivalam, 1998]. Beide Verbindungen sind im Grunde ein und demselben Polymer entsprungen (Abschnitt 1.1), haben jedoch im Detail stark abweichende biologische Eigenschaften [Sorlier et al., 2001]. Chitosan gilt als eine unbedenkliche, biokompatible Substanz (Abschnitt 1.5), die selbst in hohen Konzentrationen keinerlei gesundheitsgefährdende Nebenwirkungen aufweist [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007]. Aufgrund dieser hervorragenden Eigenschaften findet Chitosan bereits breite Anwendung unter anderem in Medizin und Agrarkultur (Abschnitt 1.6). Von besonderem Interesse sind die antimikrobiellen Eigenschaften des Chitosans (Abschnitt 1.7.2.2). Chitosan gilt als biokompatibel und für Eukaryoten ungefährlich. Andere Wirkstoffe in Bioziden (wie Triclosan, TBT, Glutaraldehyd) hingegen, bleiben selten ohne Wirkung auf den befallenen Organismus oder die Umwelt [BVL, 2011]. Chitosan geht aus Chitin hervor, dass als „Abfallstoff“ aus der Nahrungserzeugung von Schalentieren (Abschnitt 1.3 und 1.4) schon seit den 1970er Jahren eine nahezu kostenlose Rohstoffquelle [Roberts, 2007] darstellt. Aus diesem Grund wird Chitosan als umweltschonender, nachwachsender Rohstoff gehandelt. Das Interesse der Anwender hat sich seither weiter potenziert, da es kaum vergleichbare natürliche Biopolymere gibt. Die Kombination verschiedener Merkmale, wie die antibakterielle Wirkung, die wundheilenden Eigenschaften ebenso wie die Möglichkeit der Kapselbildung in der Medikamentenherstellung und die Anwendung als Stabilisator in Lebensmitteln, die sich bei Chitosan in einer Substanz vereinen, eröffnen vielfältige Wege der Nutzung in der Agrarkultur, der Kosmetik wie auch in der Nahrungsmittelindustrie und der Medizin (Abschnitt 1.6).

Die exakte Wirkungsweise des Chitosans auf Bakterien ist jedoch bisher weitestgehend unbekannt (Abschnitt 1.7.2). Es wird bisher von einer Korrelation der antibakteriellen Eigenschaften mit dem Molekulargewicht bzw. dem Acetylierungsgrad ausgegangen. Allerdings ist eine detaillierte Zuordnung der Effekte zu den Einflussfaktoren bislang kaum erfolgt und die unterschiedliche Wirkung von Chitosanen auf Mikroorganismen in Gegenüberstellung zu höheren Organismen nur in erster Annäherung verstanden.

Es ist daher erforderlich, ein möglichst breites Spektrum an physikalisch-chemischen Parametern zu detektieren, um die entscheidenden Einflussfaktoren auf die Wirkung der Chitosane genauer zu verstehen, damit diese dann gezielter einsetzen werden können.

Bei der Anwendung auf Eukaryoten wird Chitosan meist unter für die Löslichkeit ungünstigen pH-Bedingungen ($\text{pH} > 7$) eingesetzt, was die Untersuchbarkeit deutlich erschwert, da Chitosan bei diesen Bedingungen zur Aggregatbildung neigt. In der folgenden Arbeit wird versucht, dieses Defizit auszugleichen und adäquate, eukaryotische Testsysteme den prokaryotischen Wirkungen gegenüber zu stellen. Hierzu werden für die gesamte Studie die gleichen Chitosane verwendet und somit eine Vergleichbarkeit der Auswirkungen ermöglicht.

„We are only beginning to really understand Chitosan“ [Roberts, 2007].

1.1 Strukturelle Unterschiede von Chitin und Chitosan

Chitin sowie sein Derivat Chitosan ist ein aus unregelmäßig alternierenden Einheiten des N-Acetylglucosamins und des Glucosamins aufgebautes Polysaccharid [Rinaudo, 2006]. Die Monomere N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Glucosamin (GlcN) sind jeweils Derivate der D-Glucose und unterscheiden sich in ihrer Seitenkette an der C-2-Position der Hexose (Abb. 1 A und B). N-Acetylglucosamin weist eine Amidogruppe anstelle einer Aminogruppe auf, wie sie beim Glucosamin an dieser Stelle zu finden ist.

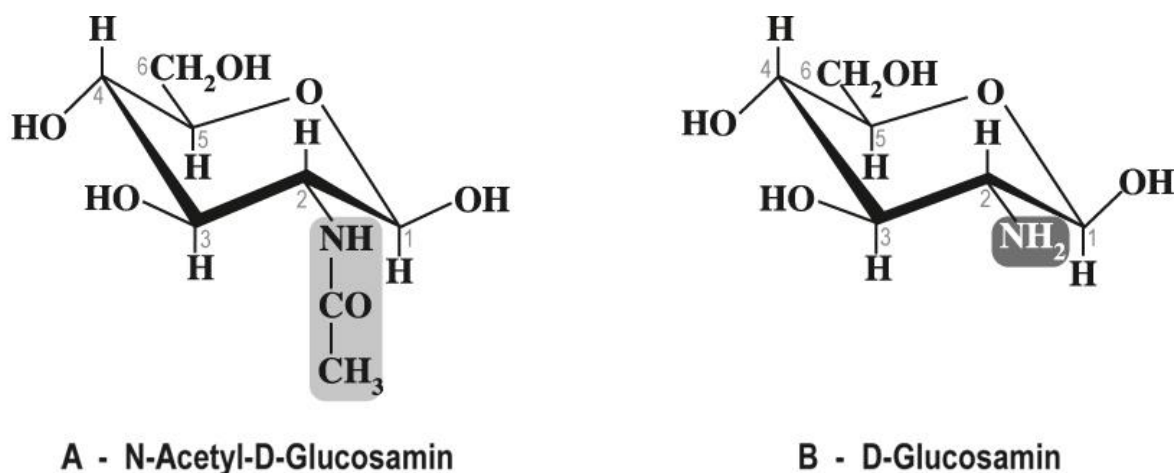


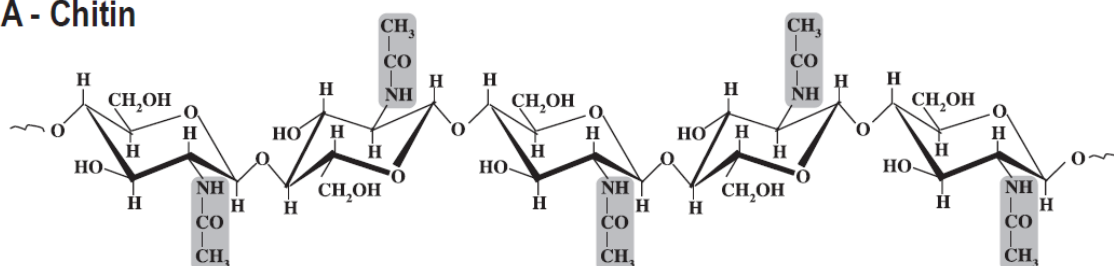
Abb. 1: Chemische Struktur der Monomereinheiten des Chitosans

A: N-Acetyl-D-Glucosamin und B: D-Glucosamin mit Enumeration der C-Atome des Hexamers. Die charakteristischen Seitengruppen sind grau hinterlegt - A:Amidogruppe (mittelgrau) und B: Aminogruppe (dunkelgrau). Abbildung verändert nach [Rinaudo, 2006].

Chitin besteht hauptsächlich aus β -1,4-glycosidisch verknüpften N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten, enthält aber zusätzlich einige Einheiten des D-Glucosamins [Rudall, 1963]. Die Unterscheidung von Chitin und Chitosan (Abb. 2 A und B) erfolgt über den Anteil an N-Acetylglucosamin und Glucosamin mit ihren acetylierten beziehungsweise deacetylierten Seitengruppen (was im Allgemeinen als der Acetylierungs- bzw. Deacetylierungsgrad bezeichnet wird) und dem damit verbundenen Löslichkeitsverhalten. Ausgehend von einem Acetylierungsgrad (F_A) von 0.50 oder weniger (d.h. über 50 % der vorliegenden Monomere sind Glucosamine anstelle von N-Acetylglucosaminen) ist Chitin in verdünnten organischen Säuren löslich und wird als Chitosan bezeichnet [Khor & Lim, 2003; Rinaudo, 2006].

Mittlerweile wird überwiegend Essigsäure zur Lösung von Chitosan eingesetzt. Die European Chitin Society hat 2007 per Definition festgesetzt, dass bei einer Löslichkeit in 0,1 M Essigsäure von Chitosan anstelle von Chitin zu sprechen ist [Roberts, 2007]. Dies erweiterte die vorangegangene Definition, setzt sie aber weiterhin in Abhängigkeit zum Acetylierungsgrad.

A - Chitin



B - Chitosan

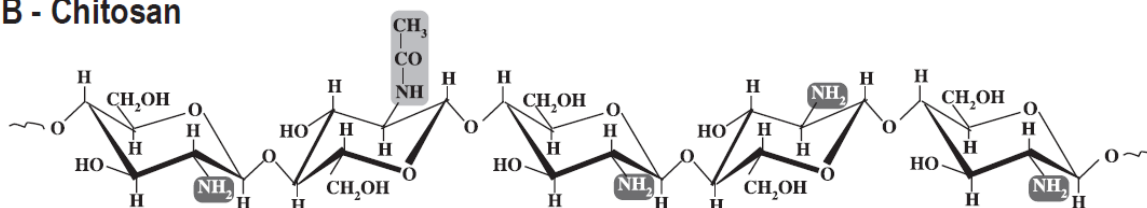


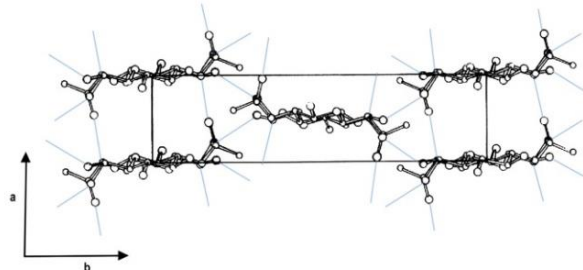
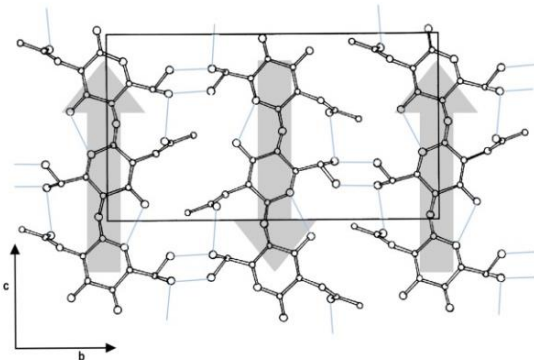
Abb. 2: Kettenstruktur von Chitin und Chitosan

Offene Kettenstruktur von A: Chitin und B: Chitosan, jeweils mit Markierung der Amidgruppen (mittelgrau) und Aminogruppen (dunkelgrau). Abbildung verändert nach [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007].

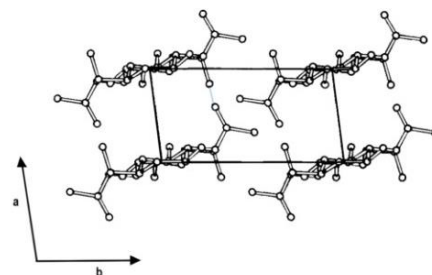
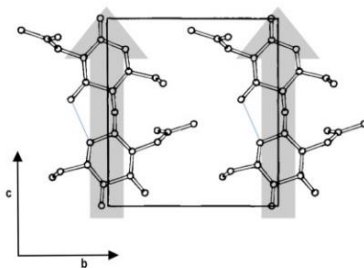
Eine alleinige Charakterisierung der Chitosane über den Acetylierungsgrad ist allerdings nicht ausreichend. Beispielsweise spielen die in der Natur vorliegenden kristallinen Strukturen des Chitins eine Rolle, welche als geschichtete oder Faltblatt-Strukturen angeordnet sein können [Blackwell, 1969]. Über Röntgenbeugungs-Analysen konnte ermittelt werden, dass das Chitin

in antiparallelen Ketten (bezeichnet als α -Chitin) oder in parallelen Ketten (bezeichnet als β -Chitin) angeordnet sein kann. Darüber hinaus existiert eine dritte Form, das γ -Chitin (zwei parallele Ketten im Wechsel mit einer antiparallelen Kette), welches vermutlich jedoch nur eine Variante des α -Chitins darstellt [Rinaudo, 2006; Rudall, 1963].

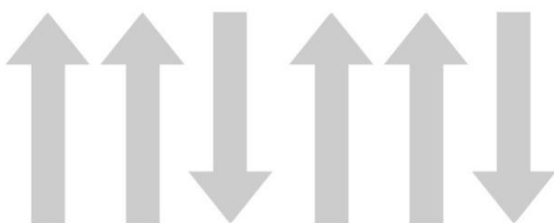
A - α -Chitin



B - β -Chitin



C - γ -Chitin



| Kristallographische Parameter: | |
|--------------------------------|------------------|
| α -Chitin: | β -Chitin: |
| a = 0.474 nm | a = 0.485 nm |
| b = 1.886 nm | b = 0.926 nm |
| c = 1.032 nm | c = 1.038 nm |

Abb. 3: Strukturen und Kettenanordnung von α -, β - und γ -Chitin

Richtungsverlauf der Kettenstrukturen von A: α -Chitin, B: β -Chitin und C: γ -Chitin. Zu erkennen ist die Richtung, angegeben durch graue Pfeile, und die Verschiebung der Ketten zueinander, angegeben durch das Quadrat sowie die kristallographischen Parameter. Die blauen Linien zeigen die Ansatzstellen der Wasserstoffbrückenbindungen. Abbildung verändert nach [Gardner & Blackwell, 1975; Minke & Blackwell, 1978; Rudall, 1963].

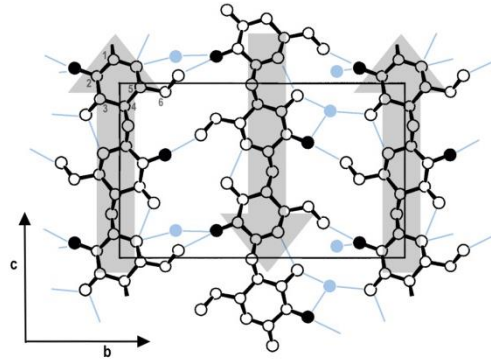
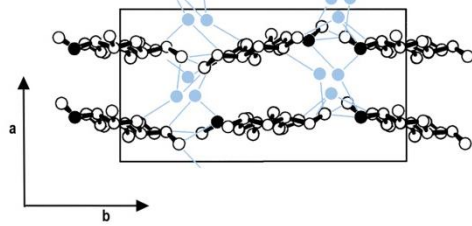
Bei der vergleichenden Strukturdiskussion von anhydriem β -Chitin versus α -Chitin fällt in der Projektion (Abb. 3) auf, dass entlang der ab-Diagonalen im α -Chitin alle Hydroxylgruppen der Seitenketten Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, die im β -Chitin auf der Ebene des Pyranoserings fehlen. Hierdurch gewinnt β -Chitin gegenüber α -Chitin

bessere und reversible Quelleigenschaften in Wasser, was sich positiv auf das Löslichkeitsverhalten auswirkt [Minke & Blackwell, 1978]. Allerdings ist α -Chitin im Vergleich zu β -Chitin thermodynamisch weitaus stabiler, auf Kosten einer verringerten Reaktivität bei der Modifikation der Substituenten [Kurita, 1998; Rinaudo, 2006].

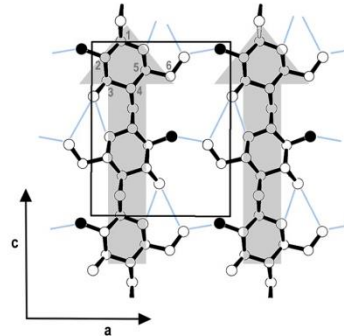
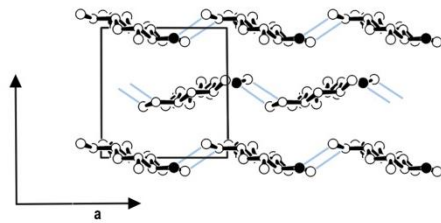
Beim Chitosan wird allerdings nur hilfweise und bislang hauptsächlich im asiatischen Raum von α -oder β -Chitosan entsprechend der Rohstoffquelle (pilzliches oder tierisches Chitin) gesprochen, obwohl auch hier die intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen die Struktur und die Eigenschaften bestimmen [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007].

Der Großteil des bislang untersuchten Chitosans entspricht dem α -Chitosan [Minke & Blackwell, 1978]. Während bei der Kettenstruktur des Chitins bislang nur die Form einer „*extended twofold*“ Helix bekannt ist, sind beim Chitosan konformativ vier kristalline Formen voneinander zu unterscheiden. Die natürlich vorkommende Form ist die des Typ I mit antiparallel verlaufenden Ketten einer „*extended twofold*“ Helix (entsprechend dem α -Chitin), die zu einer Art Zickzack-Struktur führen. Die übrigen drei Formen gehen aus vielfältig behandelten Chitosansalzen, gelöst in unterschiedlichen Säuren, hervor (Typ II, Typ IIa und Typ III) [Ogawa et al., 2004]. Davon ist der Typ II die vornehmliche Struktur, die u. a. bei Verbindungen mit Säuren entsteht. Bei Chitosanen liegt neben dem natürlichen „*hydrated*“ (auch bezeichnet als „*tendon*“) (Abb. 4 A) noch ein durch Erhitzen herbeigeführtes „*anhydrous*“ (auch bezeichnet als „*annealed*“) Polymorph vor (Abb. 4 B). Beide bilden eine durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen dem Sauerstoff des 3. und 5. C-Atoms der Monomere stabilisierte „*extended twofold*“ Helix [Okuyama et al., 2000]. Aufgrund der schwächeren Bindungen spielen die Wasserstoffbrücken zwischen dem Sauerstoff des 3. und 6. C-Atoms der Monomere (Abb. 1) bei der Stabilisierung nur eine untergeordnete Rolle. Intermolekular wird die Konformation zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbildungen zwischen dem Stickstoff an Position C-2 und dem Sauerstoff an Position C-6 der benachbarten Kette verstärkt [Okuyama et al., 1997; Yui et al., 1994]. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Wassergehalt. Die Konformation der Chitosansalze kann leicht über Änderungen in der Handhabung ineinander überführt werden. Nach einer Säurebehandlung liegt das Polymer als Typ II in Form einer „*relaxed twofold*“ Helix (Abb. 4 C) vor, die aus asymmetrisch angeordneten Einheiten aus Tetrasacchariden besteht und nur durch wenige Wasserstoffbrücken stabilisiert wird [Okuyama et al., 2000].

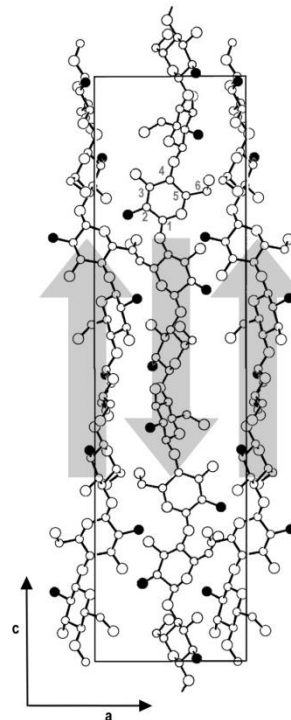
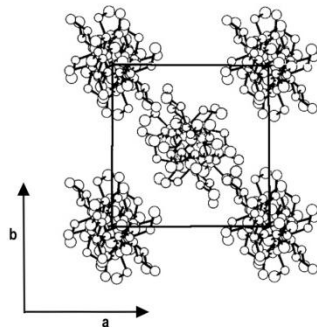
A - hydrated Chitosan



B - anhydrous Chitosan



C - Chitosan/Essigsäure-Komplex (Typ II)



| Kristallographische Parameter: | | |
|--------------------------------|--------------|--------------|
| A: | B: | C: |
| a = 0.826 nm | a = 0.895 nm | a = 1.058 nm |
| b = 0.850 nm | b = 1.697 nm | b = 1.085 nm |
| c = 1.043 nm | c = 1.034 nm | c = 4.080 nm |

Abb. 4: Chitosanformen mit inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Konformationen der Chitosanketten ändern sich in Abhängigkeit vom Lösungsmittel. A: in Anwesenheit von Wasser, B: in Abwesenheit von Wasser; C: gelöst in Essigsäure; entlang der a-Achse wurde nur die vordere Ebene der Chitosanketten abgebildet; blaue Markierung: konstatierte Wasserstoffbrückenbindungen und eingebundene Wasserstoffmoleküle; schwarze markierte Moleküle: Stickstoffatome der NH₂-Gruppe (in der c-Achse der Abb. C nicht angegeben). Die Ausrichtung der Ketten ist durch graue Pfeile gekennzeichnet. Die Verschiebung der Ketten zueinander wird durch das Quadrat und die kristallographischen Parameter angegeben. Abbildung verändert nach [Okuyama et al., 1999; Okuyama et al., 2000; Okuyama et al., 1997].

Die Eigenschaften eines Chitosans stehen in direktem Zusammenhang mit der Stereochemie der Ketten, u. a. erhöht sich mit steigendem Acetylierungsgrad aufgrund der sterischen Bedingungen auch die Kettensteifigkeit [Schatz et al., 2003]. Doch in anwendungsbezogenen Untersuchungen wird die Konformation zumeist kaum beachtet. Häufiger findet eine Unterscheidung entsprechend dem Molekulargewicht in nieder-, mittel- und hochmolekulares Chitosan statt. In den letzten Jahrzehnten hat der Acetylierungsgrad zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dies gilt auch für weitere Faktoren (u. a. die Verteilung der Acetylgruppen über die Kette, das Molekulargewicht sowie der pH-Wert und der pK-Wert des Lösungsmittels), die für die Eigenschaften und besonders für das Löslichkeitsverhalten des Chitosans von Bedeutung sind [Rinaudo, 2006; Schatz et al., 2003].

1.2 Physikalisch-chemische Parameter natürlicher Polymere

Die grundlegende Veränderung, die das Molekül durch den Übergang von Chitin zu Chitosan erfährt, ist der Ladungsaustausch an den Acetylgruppen, beziehungsweise den Aminogruppen. Hierbei wird das negativ geladene Chitin in ein Chitosan mit positiv geladenen Ammoniumgruppen transformiert [Khor & Lim, 2003]. Diese damit einhergehende Protonierung der NH_2 -Gruppe beeinträchtigt vor allem die Löslichkeit [Schatz et al., 2003], wodurch Chitosan zu einem Elektrolyt in sauren Medien und somit zu einem wichtigen Derivat von Chitin wird. Die gewonnene Löslichkeit birgt u. a. den Vorteil der besseren Charakterisierbarkeit der physikalisch-chemischen Eigenschaften und findet aufgrund seines einzigartigen Merkmals eines pseudonatürlichen, kationischen Polymers Verwendung [Rinaudo, 2006].

Ungeachtet dessen werden die Attribute eines Chitosans durch das Zusammenspiel einer Vielzahl chemischer Parameter und äußerer Faktoren bestimmt [Sorlier et al., 2001]. So beschreibt Chitosan weniger eine Einzelsubstanz als vielmehr eine heterogene Gruppe von Polymeren mit vielen unterschiedlichen Variablen [Raafat et al., 2008], wobei selbst ein einzelnes Chitosan nur die gemittelte Summe vieler Einzelketten darstellt. Ein Vergleich der zahlreichen Untersuchungen zu Chitosan ist daher bis heute nicht möglich, da vielen Anwendern nur unvollständige Angaben über ihre Chitosane vorliegen, beziehungsweise die Bestimmung der Parameter auf unterschiedlichen Analysen und Berechnungen beruht. Die Einführung eines multivariaten Systems, das einheitlich bestimmte Parameter abfragt,

nach denen Chitosane eingeordnet werden können, birgt vielseitige Vorteile besonders im Hinblick auf die Zuordnung der Parameter zu bestimmten biologischen Eigenschaften. In den letzten Jahren hat sich bereits eine Einteilung nach Molekulargewicht und Acetylierungsgrad etabliert, jedoch werden weitere Parameter zumeist vernachlässigt. Um Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen Struktur respektive Metakomponenten und biologischen Eigenschaften ziehen zu können, werden in der vorliegenden Arbeit u. a. folgende Parameter betrachtet [Weinhold et al., 2009]:

Strukturelle Einflussgrößen:

- Molekulargewicht als Gewichtsmittel (M_W [kg/mol] - *weight averaged molecular weight*)
- Molekulargewicht als Zahlenmittel (M_N [kg/mol] - *number averaged molecular weight*)
- Polydispersität (PD [M_W/M_N]),
- Polymerisationsgrad (D_P - *degree of polymerization*)
- Acetylierungsgrad (D_A - *fraction of acetylation* – F_A oder *degree of acetylation*)
- Muster der Verteilung der Acetylgruppen über die Chitosankette (P_A - *pattern of acetylation*)
- Intrinsische Viskosität ($[\eta]$ [dl/g])
- Hydrodynamischer Radius (R_h [nm])
- Mark-Houwink Analyse
- Modifizierungen, Derivate und Metakomponenten (Additive sowie Verunreinigungen)

Bei der Diversität der Einflussgrößen zeigt sich ein mögliches Defizit, welches bei der Angabe von nur zwei Parametern, wie zum Beispiel Molekulargewicht und Acetylierungsgrad, entstehen kann. Üblicherweise sind dieses jedoch die einzigen verfügbaren Angaben zu einem in der Literatur verwendeten Chitosan. Darüber hinaus sind untersuchungs- bzw. umweltbedingte Einflussgrößen zu beachten, die im Zusammenwirken den Effekt des Chitosans beeinträchtigen:

Umweltbedingte Einflussgrößen:

- pH-Wert
- Lösungsmittel
- Physikalischer Zustand
- Temperatur
- Beteiligte Konstituenten

Es bestehen in der Literatur zahlreiche Diskussionen über die Notwendigkeit dieser Angaben sowie die besten Analysemethoden, jedoch werden sie im interdisziplinären Gebrauch nur selten angeführt [Kofuji et al., 2005]. Die Diskussionen in der analytischen Vorgehensweise sind weiter vorangeschritten als die anwendungsbezogenen Analysen, dabei könnte das Einsetzen der multiplen Varianten in die Auswertung zu erheblich besseren Rückschlüssen auf die grundlegenden Eigenschaften der Chitosane führen. Einige Parameter sollen im Weiteren detaillierter erläutert werden.

1.2.1 Molekulargewicht

Die Molekulargewichte der Chitosane können Größen um die 1.000 kDa erreichen [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007]. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes werden unterschiedliche Analysemethoden herangezogen, wobei die beiden bedeutendsten Methoden die Lichtstreuung und die Viskosität sind [Schatz et al., 2003].

Lange Zeit wurde das Molekulargewicht mittels der Mark-Houwink Gleichung indirekt über die intrinsische Viskosität $[\eta]$ bestimmt (Abschnitt 1.2.6). Die empirisch ermittelten Konstanten, die in Abhängigkeit zum Polymer und dem Lösungsmittel unterschiedlich ausfallen [Roberts & Domszy, 1982], sind über die Literatur frei verfügbar. Für gewöhnlich verhalten sich die Viskosität und das Molekulargewicht proportional zueinander, weswegen die Ermittlung der Viskosität bislang ein einfaches Mittel zur Festlegung des Molekulargewichtes darstellte [Zhang et al., 2010]. Allerdings wurde die Annahme des linearen Zusammenhangs unlängst entkräftet [Kofuji et al., 2005]. Eine weitere Methode zur Detektion des Molekulargewichtes findet sich in der „*Gel Permeation Chromatography/Size Exclusion Chromatography*“ (GPC/SEC), wodurch eine Kombination der Lichtstreuung mit der Brechungsindex-Detektion die Kalkulation des Molekulargewichtsprofils ermöglicht. Die ermittelten Molekulargewichte werden in der Polymerchemie mit dem Massenanteil (*weight averaged molecular weight*) oder mit dem Zahlenanteil (*number averaged molecular weight*) gewichtet und als M_W oder M_N dargestellt [Koenig, 1992].

Bezogen auf die Beeinflussung der antibakteriellen Aktivität wird dem Molekulargewicht eine große Bedeutung beigemessen. So zeigen Chitosane mittleren oder hohen Molekulargewichts eine stärkere Hemmung des bakteriellen Wachstums als Chitosan-Oligomere [No et al., 2002].

1.2.2 Polydispersität

Die Polydispersität ist die Angabe der Verteilung der Molekulargewichte nicht uniformer Polymere, wobei der Quotient aus gewichtsmittlerem und zahlenmittlerem Molekulargewicht gebildet wird [Koenig, 1992]. Mit steigender Polydispersität verbreitert sich die Molekulargewichtsverteilung.

1.2.3 Polymerisationsgrad

Der Polymerisationsgrad D_p bezeichnet die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten, die innerhalb einer Kette vorliegen und bildet bei Homopolymeren den Quotienten des Molekulargewichts der gesamten Kette und der Monomereinheit, wodurch ein proportionaler Zusammenhang entsteht [Koenig, 1992]. Beim Heteropolymer Chitosan ändert sich das mittlere Molekulargewicht (MW) allerdings ebenfalls in Abhängigkeit vom Acetylierungsgrad, während der Polymerisationsgrad nahezu konstant bleibt [Schatz et al., 2003]. Bei Polymeren trägt hierdurch die gemittelte Anzahl der Monomere über die gesamte Kette (Polymerisationsgrad) wesentlich zum Verständnis der physikalischen Eigenschaften bei.

1.2.4 Acetylierungsgrad

Der Anteil an N-Acetylglucosamin-Einheiten entlang einer Chitosankette wird als Acetylierungsgrad (*fraction of acetylation* oder *degree of acetylation*) bezeichnet und entsprechend mit F_A oder D_A abgekürzt. Gleichmaßen existiert auch die Formulierung Deacetylierungsgrad (*degree of deacetylation* - DD) bezogen auf den Anteil an Glucosamin-Einheiten entlang der Kette [Aranaz et al., 2009]. Entsprechend den Vorschlägen der Chitin Society sollte der F_A in Klammern angegeben werden, z. B. hinter der Bezeichnung des Chitosans [0.25] beziehungsweise Chitins [0.94] [Roberts, 2007].

Für die Detektion des Acetylierungsgrades stehen mehrere Methoden zur Verfügung, die ausführlich von Mohammad R. Kasaai [Kasaai, 2009] diskutiert wurden. Allerdings gilt die NMR-Spektroskopie als der „Gold Standard“ unter den möglichen Bestimmungsmethoden [Roberts, 2007], die überwiegend als $^1\text{H-NMR}$ nach der Methodik von Asako Hirai [Hirai et al., 1991] oder Kjell Vårum [Vårum et al., 1991b] durchgeführt wird. Der Acetylierungsgrad gilt in seiner Variabilität als maßgeblich für diverse Eigenschaften des Chitins beziehungsweise Chitosans. In den meisten Fällen lassen sich die Eigenschaften darauf zurückführen, dass sich Chitosan wie ein polykationisches Elektrolyt verhält und

mit fallendem Acetylierungsgrad die Ladungsdichte ansteigt [Sorlier et al., 2001]. Unter anderem hat ein steigender Acetylierungsgrad negative Auswirkungen auf die Komplexierung von Metallionen, was besonders ab einem F_A von über 0.7 zum Tragen kommt [Sorlier et al., 2001]. Gleichzeitig herrscht auch eine kontroverse Diskussion darüber, ob der Anteil der acetylierten Seitengruppen in direktem Zusammenhang mit einem natürlichen Abbau zu sehen ist [Kofuji et al., 2005; Kurita, 1998]. Der Acetylierungsgrad ist außerdem in besonderem Maße entscheidend für das Lösungsverhalten von Chitosanen und daran gekoppelte Attribute [Dambies et al., 2001].

1.2.5 Substitutionsmuster

Das Substitutionsmuster (*pattern of acetylation* P_A) bezieht sich auf die Verteilung der Acetyl- (A) und damit auch der Aminogruppen (D) entlang der Kette. Entsprechend dem entstehenden Muster aus D und A wird in alternierende (*alternating*: wie DADADADA), zufallsverteilte (*random*: wie DAAADADAA) oder zu Clustern geordnete (*block*: wie DDDDAAAA) Muster unterschieden. Die Sequenzmuster können unter Zuhilfenahme des Bernoulli-Modells über $^1\text{H-NMR}$ [Vårum et al., 1991b] oder $^{13}\text{C-NMR}$ [Vårum et al., 1991a] bestimmt werden. Das Ergebnis wird als Zahl zwischen 0 und 2 ausgegeben, wobei 0, 1 und 2 jeweils dem perfekten Muster einer absolut blockweisen, zufälligen und alternierenden Verteilung zugeordnet werden [Weinhold et al., 2009].

Es wird vermutet, dass dem Verteilungsmuster eine entscheidende Rolle bei der biologischen Wirksamkeit zukommt, basierend auf der Annahme, dass eine Deacetylierung des Chitosans unter heterogenen Bedingungen eher zu einer Clusterbildung und unter homogenen Bedingungen eher zu einer zufälligen Verteilung führt [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007]. Bislang konnten jedoch keine längeren Chitosanketten mit einer perfekten Clusteranordnung der Substituenten hergestellt werden.

1.2.6 Konformation

Die Konformation sowie der allgemeine physikalische Zustand eines Chitosans in Lösung stehen in direktem Zusammenhang mit dem Molekulargewicht, dem Acetylierungsgrad, dem Substitutionsmuster und der Ionenstärke [Roberts, 1992]. Im Allgemeinen wird die Konformation von Chitosan mit dem „*wormlike chain model*“ beschrieben. Bei unterschiedlichen Chitosanen treten abweichende Konformationen in Lösungen auf. Ein Zusammenhang mit dem Acetylierungsgrad konnte bislang jedoch nicht bestätigt werden

[Schatz et al., 2003]. Numerisch wird die Konformation über den Mark-Houwink-Strukturplot (M-H) erfasst. Der Strukturplot ($\log [\eta]$ vs. $\log M_w$) ergibt eine Gerade mit der Steigung (a), dessen Größe Aussagen zur Konformation des Polymers erlauben, die von einer Kugelform ($a = 0$) über eine zufallsgewundene Form ($a = 0.65-0.85$) in eine starre Kettenform ($a = 1.8$) übergehen kann [Weinhold et al., 2009]. Dabei können vorhandene Verzweigungen (*degree of branching*) unter Zuhilfenahme von $^1\text{H-NMR}$ -Spektren und Rotationsradien ebenfalls bestimmt werden [Tømmeraas et al., 2011]. Diese Verzweigungen beeinträchtigen besonders die Löslichkeit von Chitin und Chitosanen [Kurita, 1998]. Gleichzeitig ist bekannt, dass Chitosane in Lösungen in Abhängigkeit zur Konzentration zu reversiblen Aggregatbildungen neigen [Anthonsen et al., 1994].

1.2.7 Synthetische Chitosane

Gegenüber anderen Polymeren birgt Chitosan den Vorteil, dass es sich auf einfache Weise modifizieren lässt, d. h. es werden funktionelle Gruppen zugeführt bzw. ausgetauscht (Derivatisierung), was das Reaktionsverhalten der gesamten Chitosankette ändern kann [Rinaudo, 2006]. In den meisten Fällen wird durch das Lösen in verdünnten organischen Säuren oder einer gezielten Acylierung versucht, eine Verbesserung der Löslichkeit herzustellen [Feng & Xia, 2011; Rinaudo et al., 1999]. Unterschiedliche Lösungsmittel wie Salzsäure und Essigsäure erzeugen dabei ein voneinander abweichendes Lösungsverhalten [Rinaudo et al., 1999]. Ein vielversprechendes Derivat ist z. B. N-Carboxymethyl-Chitosan, welches zur Hyaluronsäure vergleichbare Fähigkeiten bietet und damit als feuchtigkeitsspendendes Mittel speziell in der Kosmetikindustrie eine Alternative bietet [Kumar et al., 2004].

1.2.8 pH-Wert

Variablen Löslichkeitsverhalten spiegelt sich ebenfalls in Abhängigkeit vom pH-Wert wider. Chitosan ist wasser-unlöslich im neutralen oder basischen pH-Bereich und wasserlöslich unterhalb von pH 6.1 [Domard, 1987; Singla & Chawla, 2001]. In Studien von Feng und Xia wird beschrieben, dass vom stark sauren Milieu hin zu einem pH-Wert von 7 eine leichte Abnahme der UV-Transmission bei 600 nm zu erkennen ist. Bei höheren pH-Werten und daher abnehmender Löslichkeit nimmt die Lichtdurchlässigkeit der Lösung rapide auf bis zu 30 % ab. Hierfür ist die Streuung an präzipitiertem Chitosan in der Lösung verantwortlich [Feng & Xia, 2011].

Über eine Derivatisierung werden Chitine und Chitosane entwickelt, die einen vom unmodifizierten Chitin/Chitosan abweichenden pH-Bereich abdecken [Kurita et al., 1991]. Verbreiteter ist jedoch die Änderung der Löslichkeitsbedingungen unter Verwendung von Säuren als Lösungsmittel. In Abhängigkeit vom Acetylierungsgrad variiert der pK_0 -Wert der freien Aminogruppen in einem Bereich zwischen 6.45 und 6.9 [Sorlier et al., 2002]. Der pKa-Wert kann in Abhängigkeit von der Ionenstärke Werte zwischen 5.5 und 7.8 annehmen [Sorlier et al., 2001].

Im Zusammenhang mit dem pH-Wert ändert sich neben der Löslichkeit auch die Formation der Wasserstoffbrückenbindungen und bildet eine Kohärenz zur Konformation der Ketten und Aggregation [Domard, 1987; Sorlier et al., 2001]. Gleichwohl spielt die Betrachtung des pH-Wertes in Bezug auf die biologische Aktivität aber bislang nur eine untergeordnete Rolle [Zheng & Zhu, 2003].

In der Literatur wird dem pH-Wert wenig Bedeutung beigemessen. Üblicherweise werden pH-Wert-Einstellungen vor Versuchsbeginn durchgeführt und im weiteren Versuchsverlauf nicht regelmäßig überprüft. Vielmehr wird in Testsystemen von einer konstanten Entwicklung des pH-Wertes vergleichbar zu den nicht chitosanbehandelten Kontrollen ausgegangen [Lin et al., 2009]. Die Biokompatibilität, die bei pH-Werten > 7 getestet wurde, wird bei antimikrobiellen Anwendungen und Untersuchungen, die überwiegend bei pH-Werten < 6 stattfinden, meist vorausgesetzt. Es fehlt allerdings der Nachweis, ebenso wie die Testverfahren, der Biokompatibilität bei basischen pH-Werten ($pH > 7$). Es ist zu beachten, dass Chitosan durch Präzipitation bei pH-Werten > 7 dem eigentlichen Test entzogen werden könnte. Unter Einbeziehung des pH-Wertes müsste die vorausgesetzte Biokompatibilität überdacht werden und infolgedessen könnten sich die Anforderungen an die Chitosane für die antimikrobielle Wirkung ebenfalls ändern.

1.3 Natürliche Ressourcen des α - und β -Chitins

Der überwiegende Teil des hergestellten Chitosans entstammt dem α -Chitin, welches vorrangig aus dem Exoskelett von Arthropoden gewonnen wird [Jang et al., 2004; Rudall, 1963], wobei der prozentuale Anteil an Chitin innerhalb der Klassen der Arthropoden variieren kann [Santhanam, 1955]. Von wirtschaftlichem Interesse sind dabei besonders die

Insekten und Krebstiere. Die Abfälle der Seidenindustrie (Seidenspanner) oder der Honiggewinnung (Honigbiene) bestehen zu 15 - 30 % aus Chitin [Nemtsev et al., 2004; Zhang et al., 2000]. Häufiger ist hingegen die Gewinnung aus Krustentierabfällen (Garnelen, Krabben, Hummer, Krill), da das Exoskelett mit bis zu 50 % den höchsten Anteil an Chitin enthält [Muzzarelli, 1973].

Als Chitinquelle bislang kaum genutzt sind Pilze [Roberts, 2007], bei denen Chitin ein fester Bestandteil der Zellwand ist. Chitin konnte bereits aus zahlreichen Basidiomyceten und Ascomyceten isoliert werden [Di Mario et al., 2008; Pochanavanich & Suntornsuk, 2002]. Allerdings ist das Chitin der Pilze im Gegensatz zu dem der Krustentiere nur von geringer Kettenlänge, so dass aus Pilzmyzel nur niedermolekulares Chitin gewonnen werden kann, was die Anwendung einschränkt [Ondruschka et al., 2008].

Das β -Chitin ist in der Tierwelt weit weniger verbreitet als das α -Chitin. Es kommt im Stamm der Mollusken (z. B. Schulpfen der Tintenfische) oder im Stamm der Anneliden (z. B. Röhren der Bartwürmer) vor [Addadi et al., 2006; Blackwell, 1969]. Gleichwohl ist der verfügbare Bestand an Abfällen aus reinem β -Chitin erheblich geringer als der des α -Chitins [Roberts, 1992].

Viele Gigatonnen an Schalentierabfällen (Crustaceen) stehen jährlich als Chitin zur Verfügung [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007]. Allein Japan gewinnt jährlich über 100 Milliarden Tonnen Chitosan aus Schalentieren, was etwa 90 % der weltweiten Produktion repräsentiert [Tsigos et al., 2000]. Die Menge des insgesamt vorhandenen Chitins hat, gefördert durch den Ausbau der Aquakulturen, in den letzten Jahren stetig zugenommen. Die Annahme es handle sich um eine nahezu kostenlose Ressource hat sich nicht bestätigt, da mittlerweile Chitinabfälle auch als Futtermittel verwendet werden. Dies ruft jedoch eine Konkurrenzsituation hervor, so dass der Bedarf die Rohstoffvorkommen zeitweise übersteigt [Roberts, 2007].

1.4 Herstellung von Chitosan aus Chitin

In den 1930er Jahren gelang Clark und Smith die Strukturanalyse von Chitin. Sie isolierten Chitin aus Hummerschalen, indem sie Carbonat mit Hilfe verdünnter Salpetersäure entfernten und im Anschluss das Zwischenprodukt unter ständiger Zugabe von frischer 20 %iger

Natriumhydroxidlösung vier Stunden erhitzten. Das entstandene Produkt wurde mit Permanganat und Bisulfit gebleicht und abschließend mit Alkohol und Ether dehydriert [Clark & Smith, 1936]. Gegenwärtig ist es möglich, den Prozess der Demineralisierung innerhalb von 15 Minuten unter Zugabe von 0.25 M Salzsäure bei Raumtemperatur durchzuführen. Die Deprotonierung wird schonender bei 70 °C über 24 Stunden mit 1 M Natriumhydroxid vollzogen [Percot et al., 2003]. Bei der Verwendung von Schulpfen zur Herstellung von β -Chitin ist eine Demineralisierung nicht nötig. Die Dimension der Deprotonierung hängt von der weiteren Verwendung ab. Mit dem Ziel einer Chitosangewinnung ist eine Inkubation von drei Stunden bei Raumtemperatur mit 1 M Natriumhydroxid ausreichend, da in weiteren Schritten die verbliebenen Proteinreste mit entfernt werden [Chaussard & Domard, 2004].

Eine systematische Herstellung von Chitosan wird standardmäßig über die partielle Deacetylierung von Chitin erwirkt [Roberts, 1992], wodurch ebenfalls noch vorhandene Spuren von Proteinen eliminiert werden [Chaussard & Domard, 2004]. Bei der Deacetylierung wird das Chitin als Feststoff über mehrere Stunden einer Lösung aus überwiegend konzentrierter Natronlauge ausgesetzt. Die Konzentration der Base wird der Einwirkzeit und der Temperatur des Prozesses angepasst, was unterschiedliche Acetylierungsgrade zur Folge hat [Roberts, 1992]. Alternativ ist auch eine enzymatische Hydrolyse über Chitin-Deacetylasen möglich [Rinaudo, 2006].

Die Beschaffenheit des Eingangsmaterials unterliegt bedingt durch ihre natürliche Herkunft einer hohen Variation. Bis zum fertigen Produkt variieren zudem sowohl die Behandlung des Eingangsmaterials als auch der Schritt der Deacetylierung, so dass die Endprodukte nahezu nie konstant von gleichbleibender Qualität sein können. Firmen bieten daher auch spezifische Chitosane („*medical grade*“) an, die synthetisch hergestellt (kurzkettige Chitosane) oder von definierter Beschaffenheit sind und einen hohen Reinheitsgrad gewährleisten, was sich im Preis widerspiegelt [Roberts, 2007]. Generell kann es durch die Verwendung eines natürlichen Produktes oder im Zuge des Herstellungsprozesses zu einem unbeabsichtigten Eintrag verschiedener Komponenten und Verunreinigungen (u. a. Proteine, Asche, Schwermetalle und Lösungsmittel) kommen, weshalb Chitosane oftmals auch vor ihrer Verwendung in der Forschung weiter aufgereinigt werden [Weinhold et al., 2009].

1.5 Biokompatibilität und Biodegradation von Chitosan

Das breite Interesse an Chitosan liegt nicht zuletzt in der allgemein akzeptierten Biokompatibilität und der biologischen Abbaubarkeit begründet. Die Biokompatibilität wird definiert und hier verwendet als die Fähigkeit in Kontakt mit Lebewesen keine negativen Effekte zu bewirken [Vert et al., 2012]. Bei Chitosan ist ein negativer Effekt auf Bakterien und Pilze erwünscht, jedoch kein negativer Effekt auf pflanzliche oder tierische Zellen bzw. Gewebe. Bereits 1968 veröffentlichten Arai und Mitarbeiter ihre Studien an Mäusen, nach denen sich 10 g Chitosan pro kg Körpergewicht harmlos auf den Körper auswirken. Weitere Untersuchungen zeigten eine Sterblichkeitsrate von 40 % ab einer Dosis von 21 g Chitosan pro kg Körpergewicht und Tag bei oraler Verabreichung. Bei gleicher Dosierung erzielt die Verabreichung von Chitosanacetat eine Sterblichkeitsrate von über 80 % [Arai et al., 1968]. In anderen Studien wird die letale Dosis LD₅₀ bei oraler Verabreichung mit 16 g Chitosan pro kg Körpergewicht angegeben [Dodane & Vilivalam, 1998].

Mittlerweile wurde die Wirkung von Chitosan weiter untersucht, insbesondere im Hinblick auf seine Wirkung als Additiv bei Wundauflagen. So vermindert Chitosan zwar geringfügig die Beweglichkeit von Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen, hat aber keinen Einfluss auf ihre Proliferation [Okamoto et al., 2002]. Vielmehr zeigen Chitosanmembranen thrombogene Wirkung [Hirano & Noishiki, 1985], so dass Chitosan gegenwärtig auch als blutstillende Wundauflage von der US Food and Drug Administration (FDA) anerkannt ist [Wedmore et al., 2006]. Ferner konnte für höhere Organismen die Biokompatibilität von Chitosanen (in Form von Membranen, Hydrogelen oder in derivatisierter Form) beim Einsatz als Kultivierungsunterlage für Knochenzellen, Nervenzellen oder respiratorischer Epithelzellen nachgewiesen werden [Haipeng et al., 2000; Risbud et al., 2001; Wang et al., 2002].

Auch bei einem medizinischen Einsatz (Wundauflage) hat die Biodegradation eine hohe Relevanz. Nach Elaboration einer gewünschten Struktur ist ein Verbleiben der basierenden Matrix (z. B. einer Kultivierungsunterlage) im Organismus nicht weiter von Nutzen. Eine Degradation von Chitosanen kann sowohl enzymatisch (über Chitosanasen) oder über eine Depolymerisation (mittels Hydrolyse oder Oxidation mit Sauerstoff) erfolgen. Im menschlichen Körper wird Chitosan überwiegend von Lysozymen metabolisiert [Vårum et al., 1997]. Untersuchungen zum Wiederaufbau von Knochenstrukturen zeigten, dass bei der Verwendung von Calcium-Phosphat-Zement versetzt mit phosphoryliertem Chitosan eine verstärkte Stabilisierung eintritt, da sich mit steigendem Chitosangehalt die Abbaurate verlangsamt [Wang et al., 2002].

1.6 Wirkung und wirkungsbezogene Anwendungsgebiete von Chitosan

Aufgrund des steigenden Umweltbewusstseins sind die Menschen mehr denn je darauf bedacht, natürliche und biologische Produkte einzusetzen. Als natürliches Polymer ist Chitosan in seinen Eigenschaften als Polykation einzigartig. Es reiht sich nahtlos in bestehende Anwendungsbereiche ein, die beispielsweise für Zellulose bereits etabliert sind (Faser- und Papiergewinnung) [Li & Hsieh, 2006].

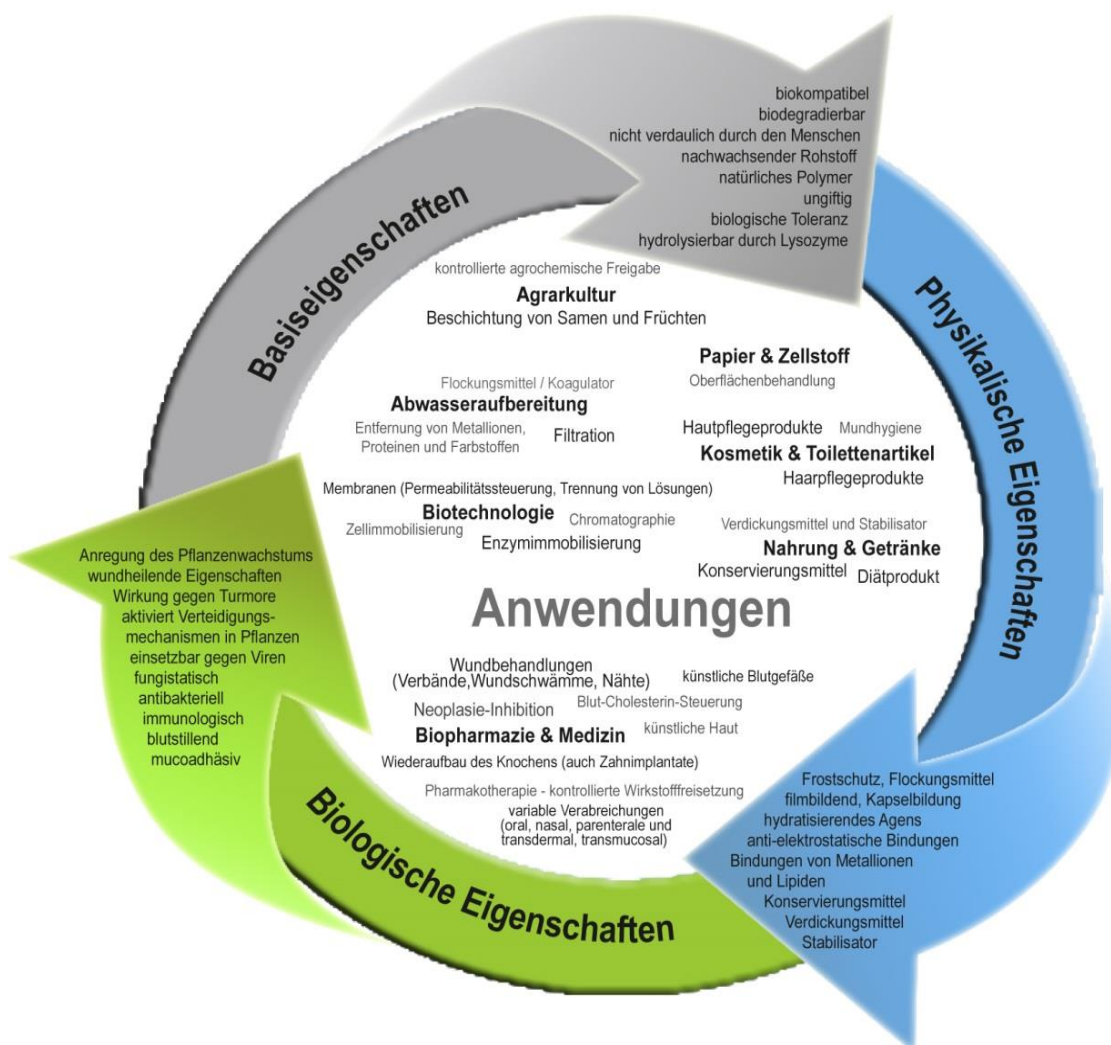


Abb. 5: Eigenschaften und Anwendungsgebiete für Chitin und Chitosan

Chitin und Chitosan werden aufgrund ihrer Vielfalt in verschiedenen Gebieten eingesetzt. Dargestellt sind die physikalischen, die biologischen und die Basiseigenschaften mit Beispielen der Anwendungsgebiete sowie übergreifende Anwendungsformen. Dabei sind beispielhaft die Hauptanwendungsgebiete verknüpft mit den bevorzugten Eigenschaften dargestellt.

Ebenso vereint es diverse Eigenschaften, die eine Anwendung von Chitosanen auf vielen weiteren Gebieten ermöglichen (Abb. 5) [Li et al., 1992; Rinaudo, 2006]. Weitere Eigenschaften können durch Derivatisierung modelliert werden, was die Vielzahl an Applikationen noch erweitert [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007].

Die Basis der Anwendungen bildet allen voran die Biokompatibilität (Abschnitt 1.5) und das sowohl ökologisch als auch ökonomisch günstige Aufkommen (Abschnitt 1.3). Wichtige Potentiale von Chitosan finden sich in den guten Bindungseigenschaften (Abschnitt 1.6.1) und den kurativen Effekten (Abschnitt 1.6.2), wodurch Chitosan in die beiden größten Anwendungsgebiete, der Nahrungsmittelindustrie und der pharmazeutischen Applikation, Einzug hält.

1.6.1 Bindungskapazitäten

Chitosan verfügt über mehrere reaktive funktionelle Gruppen, die die Bindungseigenschaften definieren. Es handelt sich hierbei um die Aminogruppe des Monomers Glucosamin und die Acetaminogruppe des Monomers N-Acetylglucosamin, sowie die primären Hydroxylgruppen (Abb. 1) an den Positionen C-2 und C-3 und die sekundären an der Position C-6. Hauptsächlich werden die Bindungseigenschaften auf den Anteil an Aminogruppen zurückgeführt, der zur Bildung von Chelaten und Flocken beiträgt und oft in Zusammenhang mit der biologischen Wirksamkeit betrachtet wird. Bei einem niedrigeren Acetylierungsgrad steigt die Anzahl an freien Aminogruppen des Chitosans, die bei Protonierung zu einer höheren positiven Ladungsdichte führen [Xia et al., 2011]. Diese hohe Ladungsdichte kann auch genutzt werden, um Chitosan an negativ geladene Oberflächen zu binden [Singla & Chawla, 2001].

Die Eigenschaft der Lipidbindung wurde bereits früh aufgegriffen und Chitosan aufgrund dieser Besonderheit als Diätmittel vermarktet. 1982 wurde in Untersuchungen von Knorr ermittelt, dass Chitosan die höhere Wasserbindungskapazität und Chitin eine bessere Fettbindungskapazität hat [Knorr, 1982]. Die Rolle des Acetylierungsgrades ist dabei jedoch strittig. Laut No und Mitarbeitern zeigt sowohl die Wasserbindungs- als auch die Fettbindungskapazität keine Korrelation zum Acetylierungsgrad [No et al., 2000]. Ein stärkerer Einfluss auf die Bindungskraft wird dem Molekulargewicht zugeschrieben. Die Fettbindungskapazität wird allerdings hauptsächlich von der Größe der Oberflächen beeinträchtigt, wobei die Kapazität mit zunehmender Oberfläche ansteigt [Ahmad et al., 2005].

Der Einsatz von Chitosan und seinen Derivaten ist u. a. in der Abwasseraufbereitung weit verbreitet, wobei die Aminogruppen zur Adsorption von Metallionen beitragen [Jin & Bai, 2002]. Als Derivat bindet Chitosan einwertige sowie zweiwertige Metallkationen, darunter Calcium, Magnesium, Kupfer, Cadmium und Eisen [Ramos et al., 2003]. Untersuchungen von Cervera und Mitarbeitern haben ergeben, dass Chitosan dreiwertiges

Cadmium und zweiwertiges Chrom in der Wasseraufbereitung effizienter adsorbiert als Aluminium. Die besten Ergebnisse konnten dabei mit Chitosan mittleren Molekulargewichts erzielt werden [Cervera et al., 2003]. Hochmolekulares Chitosan reduziert den Anteil an Radikalen und wirkt somit oxidativem Stress entgegen. Es ist ebenfalls für die Senkung eines erhöhten Cholesterinspiegels bekannt [Anraku et al., 2011]. Getestet an Mäusen bewirkt Chitosan mittleren Molekulargewichts einen Anstieg der Eisen-, Zink- und Kupfer-Konzentration, während Chitosane anderen Molekulargewichts die Konzentrationen kaum beeinträchtigten [Zeng et al., 2008].

1.6.2 Kurative Effekte

Hauptsächlich die Aminogruppen versetzen Chitosane in die Lage eine Selbstbindung einzugehen und begünstigen die Formation von Mizellen [Genta et al., 1998]. Medikamente, Enzyme und weitere Inklusionen können eingekapselt und aufgrund der Metabolisierung kontrolliert wieder freigesetzt werden. Es bietet sich somit ein alternativer Carrier für Therapeutika, insbesondere bei oraler oder nasaler Verabreichung [Prabaharan & Mano, 2005]. In Kombination mit der antimikrobiellen Wirkung (Abschnitt 1.7.1.2 und 1.7.2.2) und der unterstützenden Wirkung für den menschlichen Organismus ergeben sich verschiedene pharmazeutische und biomedizinische Anwendungen. Gleichzeitig zeigt Chitosan selbst kurative Wirkung als Additiv z. B. in Zement zum Knochenaufbau [Wang et al., 2002] sowie bei Verbandsmaterialien zur Wundheilung [Ueno et al., 2001] oder in seinem Beitrag zur Tumorprävention [Maeda & Kimura, 2004]. Ebenfalls dient Chitosan als natürlicher Kunststoff, der in pharmazeutischen Materialien Verwendung findet. Für Chitosan wurde lange Zeit keine allergene Wirkung nachgewiesen [Rinaudo, 2006] und sogar in wasserlöslicher Form als Therapeutikum für allergisches Asthma vorgeschlagen [Chen et al., 2008]. Ausschließlich vereinzelte Untersuchungen berichten über Beschwerden verursachende Effekte, wie chitiosaninduzierte Atembeschwerden und allergische Hautreaktionen [Kato et al., 2005].

1.7 Interaktion mit Zielorganismen

Bei der Betrachtung von Chitosanen und der Form ihrer Wirkung ist es unerlässlich, die Unterschiede der Wirkung in Zusammenhang mit dem Zielorganismus zu betrachten. Besonders Unterschiede in der Zellwandchemie scheinen für die Wirkung entscheidend, wie in den folgenden Kapiteln erörtert wird.

1.7.1 Pilze

Einen Bereich der Mikroorganismen bilden die Pilze. Im Gegensatz zu Bakterien sind sie eukaryotische Organismen, da ihre DNA (ebenso die Chromosomen) in der Struktur eines Zellkerns organisiert ist. Einst wurden Pilze zum Reich der Pflanzen gezählt, da sie ebenfalls eine (überwiegend) ortsgebundene Lebensweise führen. Seit 1957 wurde die Domäne der Eukarya weiter unterteilt und die Pilze bilden ein eigenes Reich, das mittlerweile auf der Basis genetischer Marker den Tieren näher steht als den Pflanzen [Dörfelt & Heklau, 1998; Madigan et al., 2001]. Das Reich der Pilze wird grob in niedere und höhere Pilze untergliedert. Zu den niederen Pilzen werden die Oomyceten gezählt, deren Zellwände vornehmlich auf Zellulose basieren und vor diesem Hintergrund auch als Zellulosepilze bezeichnet werden. Die höheren Pilze (Mycobionta) stellen Pilze im engeren Sinn dar und besitzen überwiegend Zellwände aus Chitin statt Zellulose, weswegen sie auch als Chitinpilze bezeichnet werden [Kadereit, 2002].

1.7.1.1 Zellstrukturen der Pilze

In der Erscheinung zwar ähnlich, weicht die chemische Zusammensetzung der Zellwände der Pilze von den Zellwänden der Pflanzen stark ab. In höheren Pilzen fehlt Zellulose fast vollständig. Überwiegend wird das Grundgerüst aus Chitin oder Glucan gebildet [Madigan et al., 2001]. Grundsätzlich besteht die Zellwand aus einer fibrillären Komponente und einer verstärkt gelartigen Matrix, die ineinander übergehen, wobei der fibrilläre Anteil nach innen und der gelartige Anteil nach außen hin zunimmt. Der fibrilläre Komplex ist in Schichten aus Chitin, Chitosan, Chitin-Glucan-Komplexen oder seltener Zellulose angeordnet, die ineinander greifen. Eingebettet sind diese Fibrillen in eine Matrix aus Polymeren wie Glucan oder Glykoproteinen oder Mannoproteinen (Abb. 6). Die genaue Zusammensetzung des inneren und äußeren Bereichs der Zellwand steht in Abhängigkeit zur jeweiligen Art bzw. Klasse. Bei Zygomyceten dominieren Chitosan und Chitin in der fibrillären Schicht. Begleitet wird Chitosan durch Fucose, Mannose, Galaktose, Polyphosphaten oder Gluconsäure, die ungelöst über ionische Verbindungen mit dem Chitosan gekoppelt in der Zellwand vorliegen. In den übrigen taxonomischen Gruppen der Eumycota dominieren Chitin und Glucan den fibrillären Anteil der Zellwand. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist jedoch auch hier eine geringe Menge Chitosan vorhanden [Gooday, 1994].

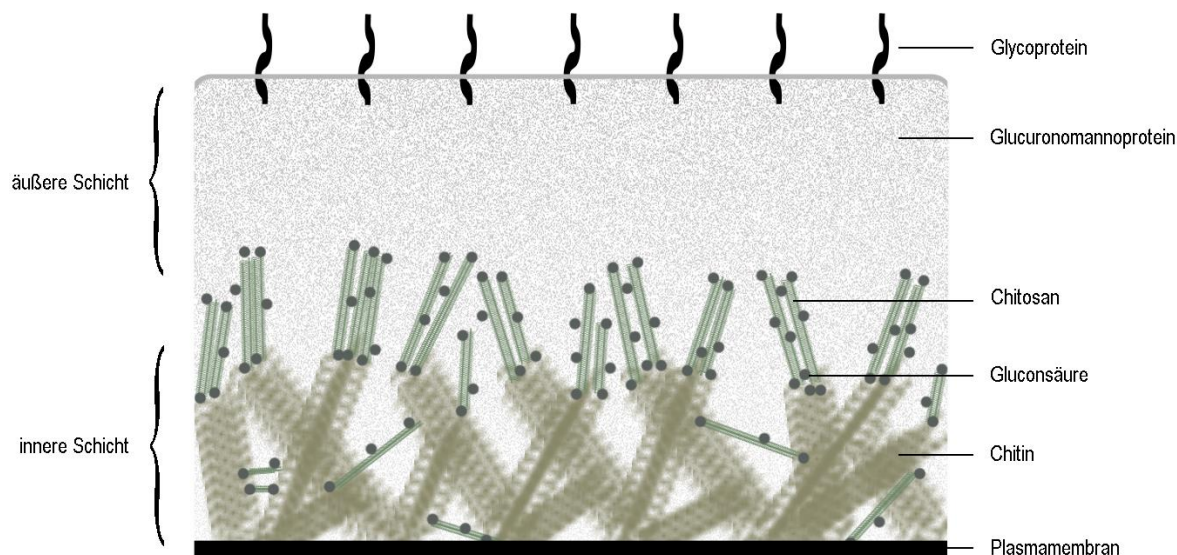


Abb. 6: Schema der pilzlichen Zellwand der Zygomyceten

Die Zellwandbestandteile entsprechen der bei Zygomyceten typischen chemischen Zusammensetzung. Die innere Schicht wird u.a. aus Chitin und Chitosan zusammengesetzt und geht in die äußere Schicht über. Abbildung erstellt nach [Gooday, 1994].

1.7.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung als Schadorganismen

Chitosan gilt verallgemeinernd als effektives Antipilz-Mittel. Viele Schimmelpilze kommen im Boden vor und zersetzen im natürlichen Kreislauf organisches Material und biologische Rückstände, was bei Lebensmitteln allerdings zu Fäulnis und Verderben führt. Pilze sind in der Lage, sich den Bedingungen unterschiedlichster Lebensräume anzupassen und sind daher weit verbreitet. Bekannte Vertreter sind Pilze der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* [Kadereit, 2002; Madigan et al., 2001]. Als Schadorganismen sind Pilze von hoher Relevanz. Bei Nutzpflanzen wird ein großer Teil der Infektionskrankheiten durch Pilze ausgelöst und häufig kann nach Befall aus technischen Gründen keine Behandlung mehr vorgenommen werden. Sekundäre Erreger (Überträger und ähnliche Quellen) werden daher verstärkt im Vorfeld eliminiert und andere präventive Maßnahmen zur Vermeidung eines pilzlichen Befalls (geeignete Kulturmaßnahmen, Fruchtwechsel) ergriffen [Madigan et al., 2001]. Viele Fungizide sind sehr aggressiv und toxisch, daher ist eine umweltverträgliche Lösung von großem Interesse. Die Wachstumshemmung der Pilze variiert mit dem Aufbau der Zellwand. Pilze, deren Zellwand Chitosan beziehungsweise Chitin enthalten, reagieren mit kaum beeinträchtigtem Wachstum auf Chitosan [Allan & Hadwiger, 1979]. Eine drei- bis zehnfach erhöhte fungizide Effektivität ist indes beim Einsatz von Chitosanderivaten nachweisbar, wobei die besten fungiziden Effekte mit N-Dodecyl-Chitosan, N-p-Isopropylbenzyl-Chitosan und N-2,6-Dichlorobenzyl-Chitosan erzielt wurden [Rabea et al., 2005].

1.7.2 Bakterien

Chitosan ist wirksam gegen verschiedene Mikroorganismen, darunter Viren (speziell Phagen) [Kochkina & Chirkov, 2000], Pilze und Bakterien. Ein besonderes Interesse liegt bei den Untersuchungen von Mikroorganismen auf dem Effekt der bakteriellen Inhibition. Bakterien repräsentieren eine eigene Domäne neben den Archaea und den Eukarya. Bakterien kommen ubiquitär vor, da sie nahezu jede Nische besetzen und sich an die jeweils bestehenden Bedingungen anpassen können. Neben den krankheitserregenden gibt es eine Reihe nützlicher Bakterien, die z. B. Nährstoffe aus dem Boden mobilisieren (*Bacillus subtilis*) oder in Symbiose mit terrestrischen (*Escherichia coli*) wie marinen (*Vibrio fischeri*) Organismen leben [Madigan et al., 2001].

1.7.2.1 Grampositive und gramnegative Bakterien

Der Mechanismus, in den Chitosan inhibitorisch eingreift, ist bislang nicht genau geklärt. Es scheint eine Kopplung unterschiedlicher Eigenschaften des Chitosans zu sein, welche die Membranen durch Störungen des strukturellen Aufbaus in ihrer Funktion als Barriere unterminiert [Je & Kim, 2006] (Abschnitt 1.7.2.2). Aus diesem Grund steht die Zellwandbeschaffenheit grampositiver und gramnegativer Bakterien immer wieder zur Disposition. Grampositive Bakterien verfügen über eine starre Zellwand, die zu 90 % aus Murein (Peptidoglykan) gebildet wird. Murein besteht aus Glykanteptiden gebildet aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Die Glykankette ist über Peptidbindungen verknüpft und bei grampositiven Bakterien über Pentaglycinbrücken quervernetzt. Die Zellwand gramnegativer Bakterien besitzt hingegen eine äußere Membran und nur eine dünne Mureinschicht (ca. 10 % der Zellwand), deren Quervernetzung üblicherweise über Peptidbindungen erfolgt [Salton, 1963] [Madigan et al., 2001].

Neben der differierenden Beschaffenheit und Ausprägung der Mureinschicht bestehen weitere Unterschiede zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien, die besonders an den beiden Modelorganismen *Escherichia coli* (*E. coli*, gramnegativ) und *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, grampositiv) näher untersucht wurden. Die Zellwand gramnegativer Bakterien besteht aus einer äußeren Membran, der Mureinschicht, die innerhalb des periplasmatischen Spalts liegt und einer inneren Membran, die direkt an die Zytoplasmamembran grenzt (Abb. 7). Es kommt vor, dass die Zellwand von einer Kapsel umgeben ist. Allein bei den Enterobakterien sind bisher zwei unterschiedliche Kapselproteine gefunden worden [Oliver, 1996]. Die äußere Membran kommt nur bei gramnegativen Bakterien vor und wird aus zwei Lipidformen, den Lipopolysacchariden (LPS) und den Phospholipiden, gebildet.

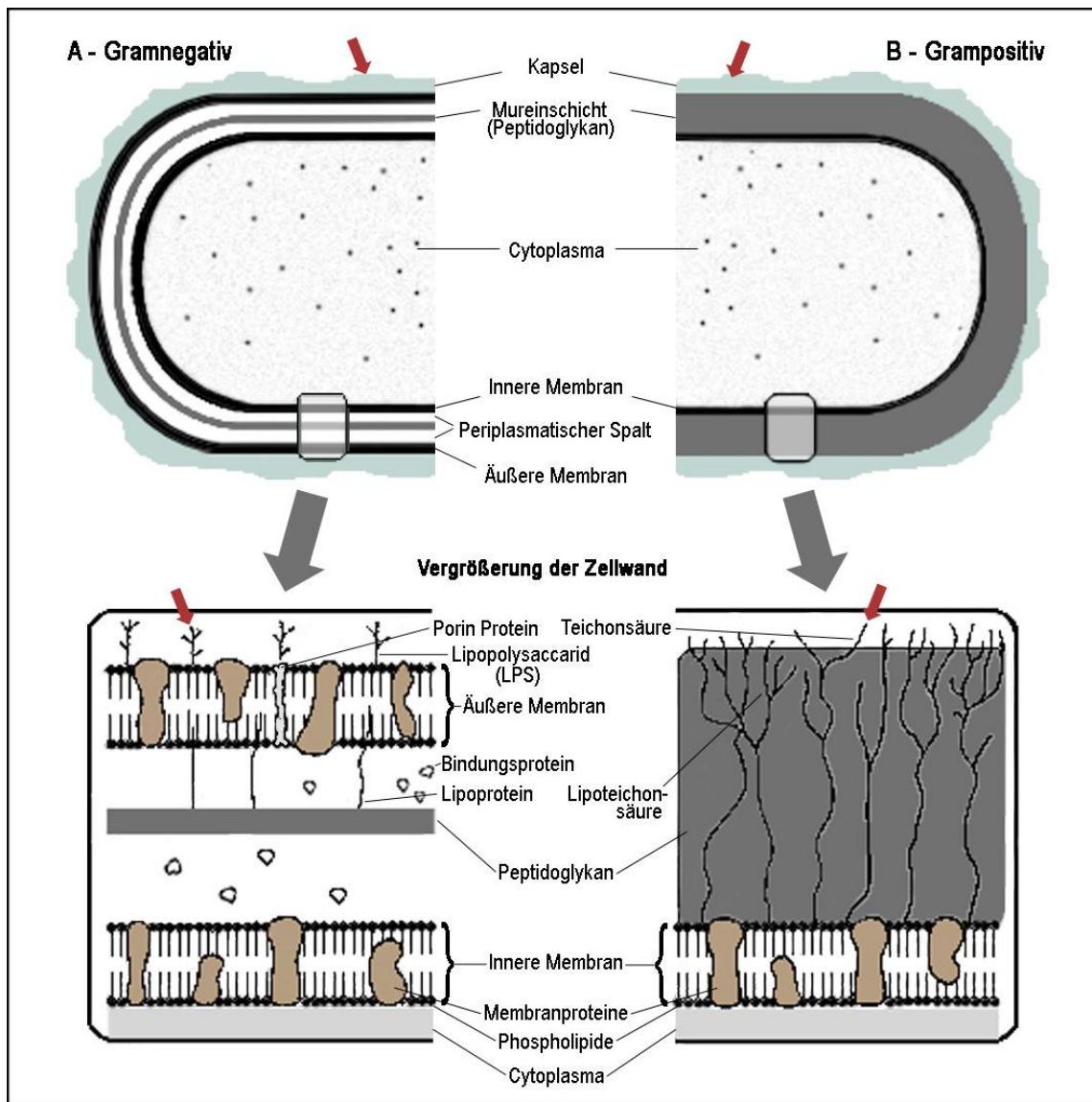


Abb. 7: Aufbau der Zellwand grampositiver und gramnegativer Bakterien

Der Zellwandaufbau im Detail von A: gramnegativen und B: grampositiven Bakterien. Die obere Darstellung entspricht einem Längsschnitt durch das Bakterium. Der gekennzeichnete Ausschnitt der Zellwand ist im unteren Abschnitt nochmal im Detail abgebildet. Die vermutlich primären Ansatzpunkte des Chitosans sind mit roten Pfeilen markiert. Abbildung verändert nach [Madigan et al., 2001; Salton & Kwang-Shin, 1996].

Die membranassoziierten Proteine sind hauptsächlich Murein Lipoproteine, Porine, OmpA Proteine, Rezeptoren und Transportproteine. In der Membran der Enterobakterien befinden sich für die Gattung typische Antigene (ECA) (Polysaccharide) [Oliver, 1996]. Bei grampositiven Bakterien existiert keine äußere Membran. Auf die potentielle Kapsel folgt die dicke, mehrschichtige Mureinschicht aus Peptidoglykan (Abb. 7). Die Peptidoglykanschicht wird gebildet aus β -(1-4)-verknüpftem N-Acetylglucosamin und N-Acetalmuraminsäure, in deren Matrix bei grampositiven Bakterien zahlreiche Teichonsäure-Komplexe (saure Polysaccharide) verankert sind [Warth & Strominger, 1971]. Die Ribitol-Teichonsäure stellt einen Anteil von 60 % der Zellwand grampositiver Bakterien dar und enthält Alanine,

Glucose, Ribitol und Phosphate [Armstrong et al., 1960]. Bei gramnegativen Bakterien befindet sich eine 5 bis 8 nm breite Peptidoglykanschicht im periplasmatischen Spalt. Dieser Spalt liegt mit einer Größe von 13 bis 25 nm zwischen der äußeren und der inneren Membran und ist ausgefüllt mit semifluiden periplasmatischen Proteinen (Periplasma). Das Periplasma umfasst dabei Bindungsproteine (Rezeptoren, Kopplungsenzyme), katabolische Enzyme (Fragmentierung - für den Transport über die innere Membran), entgiftende Enzyme (Schutzfunktion) und Enzyme für die Biogenese (von Hüllproteinen, Peptidoglykan, LPS, Kapselproteinen und MDOs - *membran derived oligosaccharides*) [Oliver, 1996]. Die Zellwand wird an der dem Zytoplasma zugewandten Seite von der inneren Membran sowohl bei grampositiven als auch bei gramnegativen Bakterien abgeschlossen (Abb. 7). In ihrer Struktur ist die innere Membran vergleichbar mit den Zytoplasmamembranen der Eukaryoten. Sie wird aus Phospholipiden gebildet, die sich zu 70 bis 80 % aus Phosphatidylethanolamin (PE), 15 % bis 20 % Phosphatidylglycerol (PG) und 5 % bis 10 % Diphosphatidylglycerol zusammensetzt. Sie reguliert den An- und Abtransport von Nährstoffen und Metaboliten der Bakterienzelle [Kadner, 1996].

1.7.2.2 Bakterizide respektive bakteriostatische Wirkung von Chitosanen

Über den Prozess des bakteriziden Effekts bestehen mehrere Theorien, die sich auf die Veränderung des strukturellen Aufbaus der Membranen, der Zellwand oder der Mureinschichten beziehen, in Abhängigkeit vom Zellwandaufbau grampositiver beziehungsweise gramnegativer Bakterien (Abb. 7). Es wird davon ausgegangen, dass Chitosan eine Ionenbindung mit der Oberfläche der Bakterienzelle eingeht. Dies ist möglich durch die positiv geladenen Aminogruppen an den C-2 Positionen des Chitosan Polymers (Polykation) und den anionischen Komponenten (Lipopolysaccharide, Teichonsäuren und Teichuronsäuren oder Polysaccharide der Kapsel) der Oberfläche der Bakterienzelle [Chung & Chen, 2008; Muzzarelli et al., 1990]. Im Laufe dieses Vorgangs kommt es zu strukturellen Veränderungen der Phosphorlipiddoppelschicht, woraus eine Modifikation der Permeabilität der Zellmembran und eine unplanmäßige Inkorporation, beziehungsweise Exkorporation, unterschiedlicher Substanzen resultieren. Tritt anschließend Chitosan in die Zelle ein, kann das Polymer eine Bindung mit der DNA eingehen und die Exprimierung von RNA unterbinden [Chung & Chen, 2008]. Eine Verkettung mehrerer molekularer Vorgänge ist wahrscheinlich, da eine Interaktion mit der DNA zwar mehrfach auch für grampositive Bakterien nachgewiesen wurde [Raafat et al., 2008], jedoch kann Chitosan als Makromolekül

die äußere Membran gramnegativer Bakterien nativ nicht passieren [Li et al., 2010]. Es steht fest, dass eine Depolymerisation der Membran stattfindet, ein Eingreifen in die Biosynthese oder Abbauprodukte der Membran konnten bislang jedoch nicht nachgewiesen werden [Helander et al., 2001; Raafat et al., 2008].

1993 konnten Tanaka und seine Mitarbeiter die Bedeutsamkeit des Acetylierungsgrades bei der antibakteriellen Wirkung systematisch nachweisen. Mit abnehmender Zahl der freien Aminogruppen verringerte sich der inhibitorische Effekt gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien [Tanaka et al., 1993]. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Arbeit von Chung und Chen. Sie zeigten, dass die freien Aminogruppen über eine Kopplung an Agarose in ihrer Funktion behindert werden, was die Wirksamkeit in Bezug auf den Austritt von Enzymen durch Herabsetzen der Barrierefunktion der äußeren Membran (OM) gramnegativer Bakterien verminderte [Chung & Chen, 2008].

Dem Molekulargewicht von Chitosanen kommt eine maßgebliche Bedeutung an dem antimikrobiellen Effekt zu, wie diverse Studien u. a. von Jeon und Mitarbeitern zeigen. Getestet wurden Chitosan-Oligosaccharide (COS) unterschiedlicher Kettenlänge im Vergleich zu Chitosan höheren Molekulargewichts (685 kDa). Hierbei zeigte sich, dass die Reduktion der Molekulargewichte und das Absinken der inhibitorischen Effekte in Korrelation stehen [Jeon et al., 2001]. Im Vergleich der Ergebnisse findet sich jedoch keine durchgehende Kongruenz. Unterschiedliche Versuchsbedingungen, Chitosane und Analysemethoden ergeben ein stetig wechselndes Bild der effektiven Konzentration, beziehungsweise der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) und der wirkungsvolleren Inhibition von grampositiven oder gramnegativen Bakterien [Chung & Chen, 2008; Je & Kim, 2006; Li et al., 2010].

1.7.3 Höhere Organismen

Die Unterscheidung in höhere und niedere Organismen richtet sich nach der Komplexität der Zellstrukturen. Mehrzellige Eukaryoten mit einer Kompartimentierung der Zellen in Gewebe stellen die Gruppe der höheren Organismen dar. Hierzu werden Mitglieder der Pflanzen- und Tierwelt aber auch der Pilze (Abschnitt 1.7.1) gezählt. Chitosane gelten als therapeutisch wirksames Mittel, das keine negativen Effekte im menschlichen beziehungsweise tierischen Körper hervorruft (Abschnitt 1.5 und 1.6.2). In Bezug auf Pflanzen wird überwiegend von einer stimulierenden Wirkung gesprochen. Chitosan innerviert die Meristeme und

regt Explanate aus Orchideen zum Wachstum zu knollenähnlichen Vorläufern an. Unter Chitosaneinfluss wird hieraus die Entwicklung von Spross- und Wurzelgewebe begünstigt [Nge et al., 2006]. In Untersuchungen mit Sojabohnen und Mais wurde festgestellt, dass Chitosan die Photosyntheserate beeinträchtigt, während gleichzeitig die Produktion der Biomasse nicht gefördert wird [Khan et al., 2002].

Überwiegend findet Chitosan den Einsatz als „Pflanzenstärkungsmittel“ zur Anregung der Abwehrmechanismen der Pflanze als Schutz gegenüber Pathogenen. Chitin ist Bestandteil der Zellwand pathogener Pilze. Besonders die Aktivität der Chitinasen (Enzym zum Abbau von Chitin) wird daher durch Chitosan und Chitosan oligomere stimuliert [Roby et al., 1987]. Die Verwendung von Chitosan regt in den Pflanzen eine Reihe protektiver Mechanismen an (u. a. Ansammlung von Phytoalexinen sowie Aktivierung und Ansammlung von Chitinasen, β -Glucanasen und Lipoxygenasen, Synthese von Proteinase-Inhibitoren und Morphogenese von Calli), die das Wachstum von Schädlingen, wie Protisten, Nematoden und Pilzen unterminieren. [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007; Vasyukova et al., 2001].

Gekoppelt mit den systemischen Reaktionen bei der bakteriellen Abwehr (Abschnitt 1.7.2.2) kann ein effektiver antiviraler Effekt von Chitosan ausgehen. Nicht nur der Befall, sondern auch die Ausbreitung verschiedener Viren wird über mehrere Tage durch prä- oder postinfektiöse Chitosanbehandlungen verhindert [Pospieszny & Atabekov, 1989; Pospieszny et al., 1991]. In den Untersuchungen zu Effekten des Chitosans auf Pflanzen erfolgt keine längere Exposition mit fluidem Chitosan niedrigen pH-Wertes, da die Chitosan-Lösung im weiteren Versuchsverlauf durch Wasser mit neutralen pH-Wert stetig verdünnt wird. Die längerfristige Wirkung mobilen Chitosans ($\text{pH} < 6.2$) auf Pflanzen ist daher bislang nicht bekannt.

1.8 Zielsetzung und Fragestellung

Chitosan ist seit mehreren Jahrzehnten ein begehrtes Polymer für die Industrie. Es birgt, wie dargestellt, antibakterielle, antivirale und fungistatische Eigenschaften, die eine kurative Anwendung bei gleichzeitiger Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit unterstützen, was in vielen Studien nachgewiesen werden konnte. Allerdings gehen den Ergebnissen vieler Arbeiten keine systematischen Untersuchungen der Chitosane voraus. Durch die Bestimmung weniger physikalisch-chemischer Parameter werden auch die anschließenden Rückschlüsse anhand einer beschränkten Auswahl an Parametern gezogen und es entstehen Widersprüchlichkeiten dahingehend, welche physikalisch-chemischen Eigenschaften maßgeblich für die biologischen Eigenschaften verantwortlich sind. So beschränken sich die meisten Untersuchungen auf die Parameter Acetylierungsgrad und Molekulargewicht. Ohne eine genaue Untersuchung weiterer Parameter ist jedoch auch deren Einfluss auf die biologischen Eigenschaften nicht auszuschließen. Es wäre möglich, dass anderen Einflussfaktoren, wie z.B. dem Schwermetallgehalt, eine ebenso hohe Bedeutung zukommt. Gleichzeitig ist jedes Chitosan verschieden, bedingt durch die spezifische Kombination von Parametern, wodurch z. B. Chitosane gleichen Molekulargewichts desselben Herstellers unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen (bakterizid vs. kurativ) können. Es ist daher von höchstem Interesse, wie ein und dasselbe Chitosan sowohl auf Eukaryoten als auch auf Prokaryoten wirkt. Bei den Bakterien stellt sich die Frage, ob die allgemeine Annahme, dass Chitosan grundsätzlich besser auf grampositive als auf gramnegative Bakterien wirkt, bei einer Erweiterung der untersuchten Chitosane mit mehreren variablen physikalisch-chemischen Eigenschaften weiterhin Bestand hat. Chitosan verliert zudem seine guten Löslichkeitseigenschaften bei pH-Werten über 6.3. Viele eukaryotische Testsysteme funktionieren allerdings erst bei einem pH-Wert von sieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, dieses Problem zu thematisieren und den pH-Einfluss mit zu berücksichtigen, um eine Vergleichbarkeit von eukaryotischen und prokaryotischen Testsystemen zu schaffen. Hierbei wird zum einen ein besonderer Wert auf die Transparenz aller Parameter gelegt und zum anderen werden versuchsbedingte Veränderungen berücksichtigt, um in der Auswertung ein reales Abbild der strukturellen Beschaffenheit in Relation zur Aktivität zu erlangen. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, dürfen sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht über einen normalen Schwankungsbereich durch Lagerung, Sterilisation oder Lösung verändern.

Nach Etablierung einer gering-invasiven Methode, um Chitosane (ohne Derivatisierung) in biologischen Testsystemen zu untersuchen und die Zielorganismen dabei nicht zu beeinträchtigen, ergaben sich für die Testsysteme folgende Aufgaben- und Fragestellungen:

- Welche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung besteht zwischen Chitosanen und Pro- bzw. Eukaryoten?
- Umfassen die propagierten antimikrobiellen Eigenschaften der Chitosane neben den Bakterien auch gleichermaßen andere Mikroorganismen, wie die Schimmelpilze?
- Wirken Chitosane unterschiedlich auf die zu untersuchenden grampositiven (*Bacillus subtilis*) und gramnegativen Bakterien (*Escherichia coli*, *Vibrio fischeri*) oder ist die Wirkung vielmehr abhängig von Anpassungen der untersuchten Bakterien an ihre jeweiligen Lebensräume?
- Welche physikalisch-chemischen Parameter der Chitosane zeigen Einfluss auf ihre bakterizide oder bakterio-statische Wirkung?
- Sind antibakteriell oder bakterio-statisch wirksame Chitosane gleichzeitig biokompatibel, wie allgemein angenommen, oder forcieren andere Einflussfaktoren diesen Eindruck?
- Welche physikalisch-chemischen Parameter beeinflussen die Wirkung von Chitosanen auf höhere Wasserpflanzen (*Lemna minor*)?

Die folgenden Untersuchungen fanden mit fünf unterschiedlichen Chitosanen und zwei Monomeren mit dem Ziel statt, die strukturellen Gegebenheiten der Chitosane zukünftig besser mit den biologischen Effekten verknüpfen und eine bessere Abschätzung über den Grad der Biokompatibilität vornehmen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsdesign

Die vergleichenden Untersuchungen zur biologischen Aktivität des Chitosans umfassen die Verifizierung geeigneter Vorbehandlungen des Chitosans sowie die Anpassung der Zelltests an die Anforderungen des Chitosans (Abb. 8). Einige der durchgeführten Untersuchungen (Abb. 8) finden sich im Detail beschrieben in vorliegender Arbeit wieder. Zu Beginn wurden mit einer ersten Auswahl an Chitosanen Tests für eine geeignete Darreichungsform vorgenommen, wobei Chitosane in fester wie in flüssiger Form zum Einsatz kamen. Die Verwendung als flüssiges Reagenz wurde weiter verfolgt und Untersuchungen zur Löslichkeit, Lagerung und Sterilisierung durchgeführt (Abschnitt 2.3.2). Zusätzlich wurden Kontrollen als Abgleich mit den vorpräparierten Chitosanen bestimmt und eine detaillierte Charakterisierung wiederholt durchgeführt (Abschnitt 2.3). Diese Chitosane durchliefen anschließend die zuvor optimierten Testverfahren der unterschiedlichen Zelltests zur Studie ihrer biologischen Wirksamkeit (Abschnitte 2.5). Die statistische Auswertung der Testergebnisse erfolgte abgestimmt auf die jeweiligen Assays und findet sich dort und in Abschnitt 2.6 näher beschrieben.

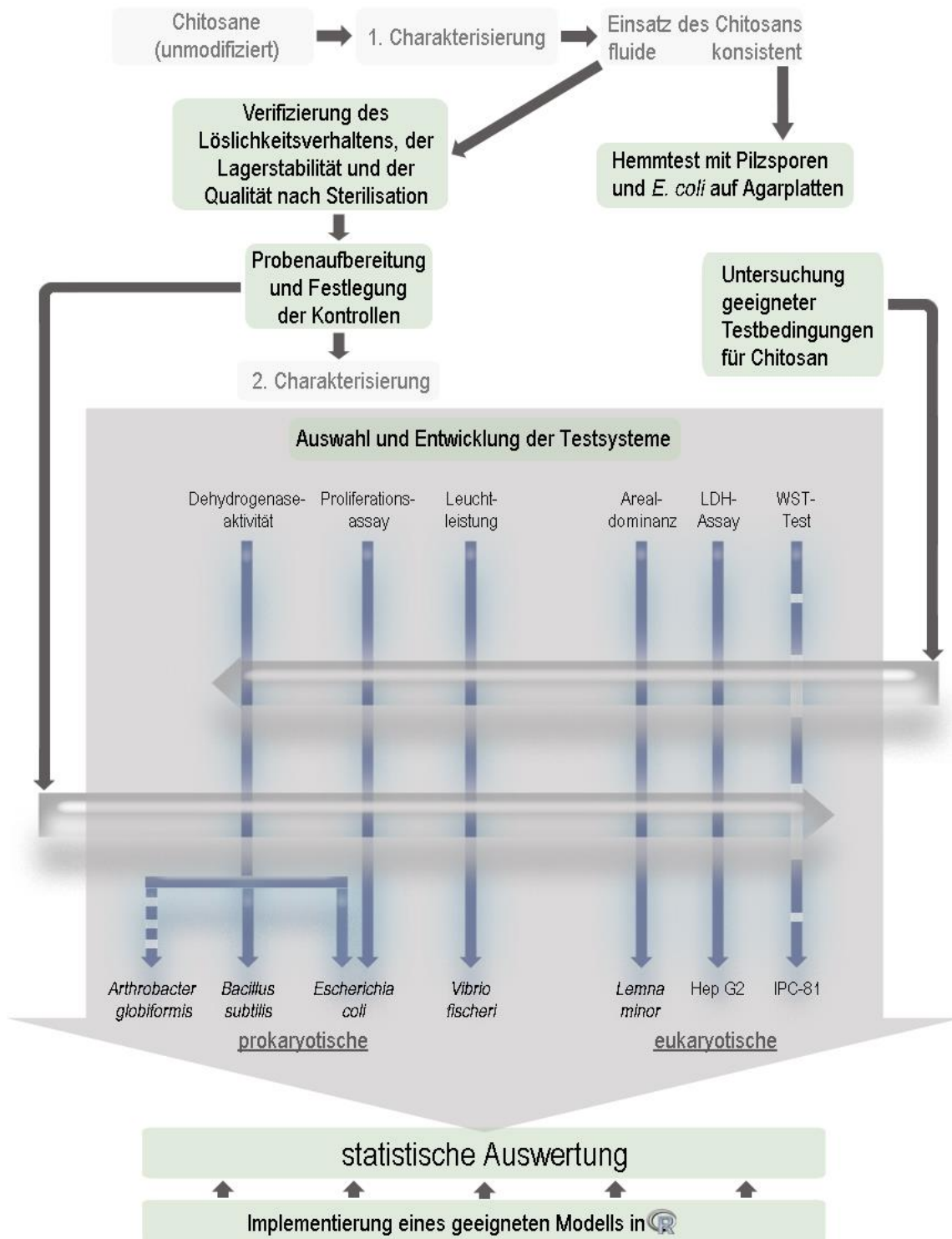



Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns

Ablauf der Versuchsreihe zur toxikologischen Untersuchung von Chitosanen. Die angegebenen Testsysteme wurden entwickelt und mit unterschiedlichen Chitosanen durchgeführt. Im oberen Abschnitt wurden vorerst die physikalisch-chemischen Eigenschaften untersucht, bevor die ausgewählten Chitosane den unterschiedlichen mikro- und makrobiologischen (bzw. prokaryotischen und eukaryotischen) Testsystemen zugeführt wurden. Die Testsysteme wurden weiterentwickelt und auf die Untersuchungsbedingungen für lösliche Chitosane angepasst. Die aufschlussreichsten Testsysteme sind in vorliegender Arbeit weiter im Detail beschrieben. Die Ergebnisse gingen in die statistische Auswertung ein, wobei für jedes Testsystem ein geeignetes Modell zur Auswertung in der statistischen Software  entwickelt wurde.

LDH: Laktat-Dehydrogenase; WST-Test: Textsystem mit wasserlöslichem Tetrazoliumsalz (WST-1); Hep G2: Zelllinie isoliert aus einem humanen Leberkarzinom; IPC-81: Leukämie Zelllinie aus der Ratte.

2.2 Medien und Puffer

Die Regulierung der pH-Werte aller verwendeten Lösungen erfolgte nach Bedarf mit Natriumhydroxid oder Salzsäure. Die Lösungen wurden ausschließlich steril eingesetzt mit Ausnahme der für die TEM-Präparation verwendeten Lösungen. Die Angaben der Bezugsquellen ist der Liste Herstellerangaben (Seite 182-184) zu entnehmen.

| | |
|--|--|
| Cacodylat-Puffer: | Cacodylsäure-Natriumsalz-Tetrahydrat |
| Glucose-Mineralsalz-Medium: | Mineralsalz-Medium mit 30 g/L Glucose |
| Hep G2-Inkubationspuffer: | 4.8 g/L HEPES 8.5 g/L Natriumchlorid 113.6 mg/L Dinatriumhydrogenphosphat 402.6 mg/L Kaliumchlorid 203.3 mg/L Magnesiumchlorid-Hexahydrat 264.6 mg/L Calciumchlorid-Dihydrat 900.8 mg/L Glucose |
| Kaliumphosphat-Puffer: (Dehydrogenaseassay) | 6.8 g/L Kaliumdihydrogenphosphat 12.2 g/L Dikaliumhydrogenphosphat 2 g/L Natriumacetat 2 g/L Glucose |
| LB-Medium: | 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Trypton 10 g/L Natriumchlorid |
| LDH-Puffer: | 9.68 g/L Trizma®base 11.686 g/L Natriumchlorid |
| CAMHB-Medium: | 22 g/L Mueller Hinton II broth cation-adjusted |
| Mineralsalz-Medium: | 700 mg/L Kaliumdihydrogenphosphat 700 mg/L Dikaliumhydrogenphosphat 700 mg/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat 1.0 g/L Ammoniumnitrat 5 mg/L Natriumchlorid 2 mg/L Eisen(III)-sulfat-Heptahydrat 2 mg/L Zinksulfat-Heptahydrat 1 mg/L Mangan(II)-sulfat-Heptahydrat |

Spurr Mixtur: 10 g ERL 4206
 6 g D.E.R. 736
 26 g NSA
 400 mg DMAE

Steinberg-Medium SL 1: 173 mM Kaliumnitrat
Stammlösungen (SL): 33 mM Kaliumdihydrogenphosphat
 3.6 mM Dikaliumhydrogenphosphat
SL 2: 20.5 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat
SL 3: 62.5 mM Calciumnitrat-Tetrahydrat
SL 4: 1.94 mM Borsäure
SL 5: 0.63 mM Zinksulfat-Heptahydrat
SL 6: 0.18 mM Natriummolybdat-Dihydrat
SL 7: 0.91 mM Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat
SL 8: 2.81 mM Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat
SL 9: 4.03 mM Titriplex III (EDTA)

Für das Ansetzen einer 1 x Nährlösung für die Stammkultur oder Vorkultur (35 mM MES) wurden 20 ml/L der Stammlösung SL 1 bis SL 3 und je 1.0 ml/L der Stammlösung SL 4 bis SL 9 miteinander vermengt. Bei einer doppelt konzentrierten Nährlösung für den Testeinsatz (70 mM MES) wurde die doppelte Menge der Nährlösung auf 1 L verwendet.

Tris-Maleinsäurepuffer: 24.2 g/L Trizma®base
(200 mM) 23.2 g/L Maleinsäure

2.3 Chitosane

Innerhalb dieser Arbeit wurden ausschließlich Chitosane einer Charge verwendet und umfangreich physikalische wie chemische Eigenschaften aufgenommen. Verwendet wurden Chitosan A [0.08] (Chipro), Chitosan B [0.02] (Chipro), Chitosan D [0.13] (Chipro), Chitosan X [0.44] (Bioneer) und Chitosan Y [0.10] (Bioneer). Die Benennung der Chitosane erfolgte nach internen Regularien und wird hier für eine bessere Zuordnung zu parallelen Publikationen beibehalten, die aus den Arbeiten des Chitosanprojektes hervorgingen. Spezifischere Angaben zu den Chitosanen ergeben sich aus den Resultaten der Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit und sind dem Ergebnisteil (Abschnitt 3.1) zu entnehmen.

2.3.1 Verifizierung der Eigenschaften der Chitosane

Die Analyse der physikalisch-chemischen Parameter der Chitosane (Abb. 8: 1. und 2. Charakterisierung), wie M_w , M_n , PD, η , R_h , D_p , F_A , P_A , der Chlorid-Gehalt sowie die Belastung durch Schwermetalle wurde in Zusammenarbeit mit der analytischen Abteilung der Arbeitsgruppe für Verfahrenstechnik der Wertstoffrückgewinnung (VdW) nach dem Verfahren von Weinhold und seinen Mitarbeitern [Weinhold et al., 2009] vorgenommen.

2.3.2 Lagerung und Sterilisation von Chitosanen

Für die nachfolgenden Untersuchungen war es notwendig, die Chitosane in Lösung zu bringen und zu halten. Als Lösungsmittel ist besonders Essigsäure geeignet. Die notwendige Menge an Essigsäure sollte in Hinblick auf weitere Einsatzmöglichkeiten des Chitosans eher gering gehalten werden. Eine äquivalente Menge an Essigsäure wird jedoch benötigt, um die Aminogruppen zu Ammoniumgruppen zu protonieren und damit das Chitosan in Lösung zu halten. Aus Tests mit nicht vollständig gelöstem Chitosan bzw. unsterilem Material konnten keine belastbaren Ergebnisse gewonnen werden. In ersten Untersuchungen fiel jedoch auf, dass die Lagerung von Chitosanen gelöst in Essigsäure sowie die Sterilisation Kettenbrüche und Veränderungen des Acetylierungsgrades hervorrufen. Aus diesem Grund wurde das Chitosan nach folgender Prozedur (siehe Standardisierung) aufgearbeitet und die entstandenen Veränderungen erneut durch die Analytische Abteilung untersucht. Im Weiteren wird daher zwischen unmodifiziertem, aufgereinigtem und standardisiertem Chitosan unterschieden. **Unmodifiziertes Chitosan** liegt direkt nach Bezug vom Hersteller vor. Die Aufreinigung für den Einsatz der Chitosane in chemischen Untersuchungen erfolgte entsprechend nachstehend beschriebenen Verfahren. Unmodifiziertes Chitosan D [0.13] wurde in 0.5 M Essigsäure (10 g/L) für 24 Stunden gelöst und vor der anschließenden Filtration und Lyophilisierung für 10 Minuten bei 3577 g in der Zentrifuge 400 R zentrifugiert, um mögliche Schwebstoffe zu entfernen. **Standardisiertes Chitosan** für den Einsatz in sterilen Testverfahren wurde nach Kenntnis der Ergebnisse aus den verschiedenen Tests zur Sterilisation und Lagerung festgelegt und wird näher in Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Für die Untersuchungen zur Lagerstabilität (Abschnitt 2.3.2.1), Sterilisation (Abschnitt 2.3.2.2) und zur Ermittlung des darauf aufbauenden Standardisierungsverfahrens (Abschnitt 3.1 und 4.1) wurde aufgereinigtes Chitosan D [0.13] sowohl in 0.1 M Essigsäure als auch separat in entmineralisiertem Wasser mit einer Endkonzentration des Chitosans von 1 g/L und

10 g/L gelöst. Für die Lagerungstests kam es zum Einsatz zusätzlicher Konzentrationen des Chitosans D [0.13] von 7.5 g/L, 5 g/L und 2.5 g/L. Als Kontrolle wurde der Feststoff derselben Behandlung ausgesetzt und kurz vor der Analyse in 0.1 M Essigsäure gelöst.

2.3.2.1 Lagerungstests

Zur Detektion von Veränderungen einer Chitosan-Stammkonzentration und zur Untersuchung geeigneter Lagerbedingungen wurden die Proben bei Raumtemperatur, 4 °C, -20 °C und -80 °C gelagert. Die Analyse der charakteristischen Parameter des Chitosans erfolgte nach 0 Stunden, 24 Stunden, 14 Tagen und 30 Tagen.

2.3.2.2 Steriltests

Um die Auswirkungen praktikabler Methoden der Sterilisation auf Chitosan zu bewerten, war es notwendig, die Proben unterschiedlichen Behandlungen zu unterziehen. Neben einer Kontrolle ohne weitere Behandlung, wurden die übrigen Proben unabhängig voneinander einer der sechs beschriebenen Präparationen unterzogen. Die Probe wurde (1) mit einem 0.8/0.2 µm *Acrodisc PF* Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert, (2) bei 1 bar und 121 °C für 20 Minuten im *SANOclav* autoklaviert, (3) für 12 Stunden einer UV-Bestrahlung (unbewegt mit 25 cm Abstand zur Lichtquelle) im UV-Entkeimungsschrank ausgesetzt, (5) bei 160 °C für 180 Minuten im Trockenschrank WTC trockensterilisiert oder (6) es wurde eine fraktionierte Sterilisation (Tyndallisation) vorgenommen, wobei die Probe an drei aufeinander folgenden Tagen für 30 Minuten in einem Wasserbad *W 350 t* von 90 °C lag. Die Bestimmung der charakteristischen Parameter des Chitosans geschah im direkten Anschluss an die jeweilige Präparation.

2.3.3 Konzentrierung der Essigsäure

Für ein gleichmäßiges Löslichkeitsverhalten wurde die zur Absättigung der Aminogruppen nötige Mindestmenge der Essigsäure mittels Acetylierungsgrad (F_A) und Polymerisationsgrad (D_p) für jedes Chitosan (bezogen auf 1 g/L Chitosan) nach Formel 1 ermittelt. Der höchste ermittelte Konzentrationswert der benötigten Essigsäure ergab anschließend den Maßstab für die Lösung aller Chitosane und Monomere.

Formel 1: Essigsäurekonzentration

$$CE = (DP - (DP \cdot FA)) \cdot CC / MW$$

- C_E : Konzentration der Essigsäure [mol/L]
 D_p : Polymerisationsgrad
 F_A : Acetylierungsgrad
 M_W : Molekulargewicht [g/mol]
 C_C : Chitosankonzentration [g/L]

2.3.4 Präparation der Testsubstanzen

Für ein gleichmäßiges Lösungsverhalten zum Einsatz in die zellulären Testsysteme (Abb. 8 und Abschnitt 2.5) mussten die Chitosane und Monomere einer einheitlichen Präparation unterzogen (= standardisiert) werden. Im ersten Schritt wurden sie in 0.1 M Essigsäure 24 Stunden gelöst (25 mg Chitosan auf 1.5 mL Essigsäure). Auf diese Weise wurde eine einheitliche Absättigung der Aminogruppen erzielt, was das Lösungsverhalten der Chitosane auch in wechselnden Medien stabilisierte. Im Weiteren erfolgte eine Filtration mit einem 0.45 µm Zellulose-Nitrat-Filter mit anschließender Lyophilisierung im *Alpha 1-2* bei -60 °C und 0.065 bar. Für die Herstellung der Stammlösung wurden die lyophilisierten Chitosane beziehungsweise die Monomere erneut 24 Stunden auf dem Überkopfschüttler *RA 20* in entmineralisiertem Wasser gelöst, mit 0.2 µm Spritzenvorsatzfiltern *Minisart RC 25* sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Tests zur biologischen Aktivität (Abschnitt 2.5) ergab sich der Einsatz der Chitosane A [0.08], B [0.02], D [0.13], X [0.44] und Y [0.10]. Zusätzlich umfassten die Untersuchungen die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin sowie die Kontrollsubstanzen Natriumacetat und Natriumchlorid. Diese wurden ebenfalls 24 Stunden in entmineralisiertem Wasser gelöst, mit 0.2 µm Filtern sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Weitere Substanzen und eine von dieser standardisierten Norm abweichende Vorbehandlung dieser Substanzen (= unmodifiziert) sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen vermerkt. In einigen nachfolgend beschriebenen Verfahren ist aufgereinigtes Chitosan D [0.13] eingesetzt worden, das ausschließlich nach dem Prinzip von Weinhold und seinen Mitarbeitern vorbehandelt wurde [Weinhold et al., 2009].

2.3.5 Gaschromatographischer Nachweis der Essigsäurekonzentration

In einer isothermen Reaktion bei 150 °C wurden 0.35 µl, 0.25 µl beziehungsweise 0.26 µl der standardisierten Chitosane A [0.08], B [0.02], D [0.13] und Y [0.10] mit einem Split von 1:80 beziehungsweise 1:30 auf eine *Optima Wax* Säule mit 0.25 µm Innendurchmesser bei 220 °C beladen und bei 220 °C per Flammen-Ionisations-Detektor auf ihre Essigsäurekonzentration untersucht. Anhand einer externen Eichreihe konnten die Konzentrationen im Gaschromatograph von Chrompack bestimmt werden. Als Trägergas diente Stickstoff.

2.4 Organismen und Zelllinien

Die Auswahl der verwendeten Organismen erstreckt sich über eine Zelllinie (Tab. 1) und *Lemna minor* (*L. minor*) als Vertreter der höheren Organismen, verschiedene Bakterien (Tab. 2) und eine Standardauswahl von Schimmelpilzen nach DIN ISO-Test 846 (1996 – 10) (Tab. 3). Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf den Bakterien, die sich jeweils in ihren Ansprüchen an die Lebensbedingungen und in ihrer Zellwandbeschaffenheit unterscheiden. *B. subtilis* ist ein häufiges aerob wachsendes, grampositives Bodenbakterium, welches Nährstoffe aus Bodenkolloiden mobilisiert [Harwood, 1989]. *B. subtilis* gehört zusammen mit *E. coli* zu den am besten untersuchten Bakterien. Beide sind stäbchenförmige und begeißelte Bakterien, die als Modellorganismen herangezogen werden. *E. coli* ist ein Darmbewohner und lebt als gramnegatives Bakterium in Symbiose mit Säugetieren [Winfield & Groisman, 2003]. *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*) gehört zu den marin-lebenden Bakterien, die bevorzugt in Symbiose mit Kalmaren leben. Nach einer Neuklassifizierung wurde es der Gattung der *Aliivibrio* zugeordnet und als *Aliivibrio fischeri* bezeichnet [Urbanczyk et al., 2007]. Aufgrund des Testverfahrens wird in der vorliegenden Arbeit jedoch die gebräuchlichere Bezeichnung *V. fischeri* beibehalten. Es handelt sich um ein gramnegatives Bakterium, welches zu natürlicher Biolumineszenz befähigt ist [Boettcher & Ruby, 1990]. Die Zellwandchemie und die Unterschiede der grampositiven und gramnegativen Bakterien ist in Abschnitt 1.7.2 näher beschrieben.

Tab. 1: Zelllinie

Herkunft und Bezeichnung der eingesetzten Zelllinie

| Zelllinie | Bezeichnung |
|--|-------------|
| Parenchym eines humanen Leberkarzinoms (Hepatozyten) | HEP G2 |

Tab. 2: Bakterien

Namen und Typstammbezeichnung der eingesetzten Bakterienstämme

| <i>Bakterium</i> | Bezeichnung |
|-----------------------------|--------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | DSM 10 |
| <i>Escherichia coli</i> K12 | DSM 498 |
| <i>Escherichia coli</i> K12 | DSM 30083 |
| <i>Vibrio fischeri</i> | NRRL-B-11177 |

Tab. 3: Schimmelpilze

Namen und Typstammbezeichnung der eingesetzten Pilze

| <i>Schimmelpilz</i> | Bezeichnung |
|--------------------------------|-------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | ATCC 6275 |
| <i>Chaetomium globosum</i> | ATCC 6205 |
| <i>Gliocladium virens</i> | ATCC 9645 |
| <i>Paecilomyces variotii</i> | ATCC 18502 |
| <i>Penicillium funiculosum</i> | CMI 114933 |

2.4.1 Anzucht der Organismen

2.4.1.1 Bakterien und Pilzkulturen

Die Aufzucht und Hälterung erfolgte bei den Bakterienkulturen auf Agaroseplatten. Das Medium und die Hälterungsbedingungen wurden dabei den späteren Versuchsbedingungen angepasst und werden in den jeweiligen Abschnitten beschrieben. Ausschließlich die Rücklagenkulturen von *E. coli* und *B. subtilis* wurden bei Raumtemperatur gehältert und alle fünf Monate unter sterilen Bedingungen auf eine neue Platte umgesetzt. *V. fischeri* stand gefriergetrocknet und die Schimmelpilze als eine Sporenlösung zur Verfügung, was eine Anzucht und Hälterung erübrigte.

2.4.1.2 *Lemna minor*

Für die Kultivierung der Stammkultur wurde in einen 250 mL Erlenmeyerkolben 150 mL des einfach konzentrierten Steinberg-Mediums gegeben und mit einem sterilen Wattestopfen aus Verbandswatte verschlossen, so dass ein ausreichender Luftaustausch stattfinden konnte. In auf 25 °C temperierte Nährlösung sollten mittels einer Impföse maximal fünf bis sechs Pflanzen von *L. minor* mit jeweils drei Fronds (Phyllokladien) unter sterilen Bedingungen übertragen werden. Die Stammkulturen wuchsen bei 25 °C und 85 % Luftfeuchtigkeit in der Pflanzenzuchtkammer *Fitotron SGC 970* bei einer Lichtstärke von 125 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$. Nach sieben bis zehn Tage Wachstum wurde die Stammkultur auf ein neues Medium umgesetzt bzw. gleichzeitig vereinzelt.

Zum Ansetzen der Vorkultur wurden aus der Stammkultur zehn Pflanzen mit jeweils drei Fronds von normalem Aussehen, normaler Größe, kräftigem Grün und ohne sichtbare Verletzungen in frisches Medium (mit 35 mM MES) übertragen. Die Kulturen verblieben bei 25 °C und 85 % Luftfeuchtigkeit sowie einer Lichtstärke von $125 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ in der Pflanzenzuchtkammer bis zwei Tage vor Testbeginn. Zu diesem Zeitpunkt war es erforderlich, die Kultur vollständig auf ein frisches Medium zu übertragen. Für den Testeinsatz durfte die Vorkultur ein Alter von sechs Tagen nicht überschreiten.

2.4.1.3 Kultivierung der Hep G2-Zellen

Die Hep G2-Zellen wurden in 25 mL Zellkulturflaschen *Nunclon Surface* in RPMI-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (pH 7.0) bei 37 °C unter kohlendioxidreicher Atmosphäre (5 %) im Brutschrank *Function Line* kultiviert. Das RPMI-Medium enthielt 2 g/L Natriumhydrogencarbonat, 2 mM l-Glutamin, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycinsulphat. Alle zwei Tage sollte das Medium erneuert werden. Bei Erreichen eines Deckungsgrades von nahezu 80 % wurden die Zellen mittels Trypsin vom Untergrund gelöst und in neue Kulturflaschen übertragen.

2.4.2 Einsatz der Organismen

Aufgrund der problematischen Löslichkeit des Chitosans war es unvermeidlich, die Bedingungen der Testsysteme abzuändern. Zusätzliche Versuche waren erforderlich, damit die Veränderungen nicht zu Lasten der Organismen gingen. In den meisten Fällen konnten belastbare Versuchsbedingungen erst durch eine Umstellung des Mediums und den Zusatz verschiedener Puffer, um den pH-Wert über die Versuchsdauer hinweg stabil zu halten, erreicht werden. Da die Wirkung von Chitosan auf Bakterien besonders strittig ist, wurde vornehmlich das Augenmerk auf die Anpassung der bakteriologischen Tests gelegt, so dass sie den Ansprüchen der Bakterien und der Organismen gleichzeitig gerecht werden. Die jeweils benötigten Veränderungen sind in den jeweiligen Abschnitten (Abschnitt 2.5) genauer beschrieben und können vom Standardverfahren abweichen.

2.5 Untersuchung biologischer Effekten verschiedener Chitosane

2.5.1 Hemmung der Sporenceimung und des Pilzwachstums

Zur generellen Überprüfung der Effekte vorliegender Chitosane auf verbreitete Schimmelpilze wurde in Zusammenarbeit mit der Materialprüfungsanstalt (Bremen, Deutschland) der DIN ISO-Test 846 (1996 – 10) nach europäischer Norm durchgeführt.

Für die Untersuchungen lagen die unmodifizierten Chitosane D [0.13], X [0.44] und Y [0.10] gelöst in 0.1 M Essigsäure (0.6 g/L) vor. Davon wurde jeweils 1 mL auf einen gereinigten Glasobjektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet. Nachdem das Chitosan zu einem dünnen gleichmäßigen Film angetrocknet war, kamen die Objektträger auf eine Agaroseplatte. Es erfolgte eine Aufteilung von jeweils vier Objektträgern pro Chitosan auf zwei Platten mit unvollständigem Mineralsalz-Medium (Ansatz 1 und 2), versetzt mit 20 g/L Agarose, und zwei Platten mit Glucose-Mineralsalzmedium (Ansatz 3 und 4). Für die weitere Testdurchführung wurden Sporen von *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces variotii*, *Gliocladium virens* und *Chaetomium globosum* zu einer Sporensuspension von 10^6 Sporen/mL angereichert und unter Druckluft auf die vorbereiteten Agaroseplatten aufgebracht. Nach einer Inkubation von 4 Wochen bei 25 °C im Brutschrank 2771 konnte das Wachstum nach folgendem Schlüssel ausgewertet werden:

1. Kein Wachstum bei mikroskopischer Betrachtung erkennbar
2. Kein Wachstum mit bloßem Auge, jedoch bei mikroskopischer Betrachtung erkennbar
3. Wachstum mit bloßem Auge erkennbar, bis zu 25 % der Oberfläche ist bewachsen
4. Wachstum mit bloßem Auge erkennbar, bis zu 50 % der Oberfläche ist bewachsen
5. Beträchtliches Wachstum, über 50 % der Oberfläche ist bewachsen
6. Starkes Wachstum, gesamte Probenoberfläche ist bewachsen


2.5.2 Inhibition der Koloniebildung von *Escherichia coli*

Für die Abschätzung der Wirksamkeit von Chitosanen als Oberflächenschutz vor bakteriellem Bewuchs wurde mittels einer Impföse eine Kultur von *E. coli* K12 (DSM 30083) in einem Schikanekolben mit 10 mL LB-Medium (mit 200 mM Tris-Maleinsäurepuffer; pH 6.0) übertragen und bei 37 °C und 125 rpm auf dem Schüttelinkubator 3031 über Nacht kultiviert. 1 mL dieser Vorkultur fungierte als Startkultur für 50 mL frisches LB-Medium, welches bis zu einer OD von 1 bei 37 °C und 125 rpm inkubierte. Anschließend fanden die Entnahme einer Probe und die dekadisch Verdünnung mit LB-Medium statt. Parallel wurden jeweils

drei Agaroseplatten (LB-Medium mit 15 g/L Agarose; pH 7.0) mit aufgereinigtem Chitosan D [0.13] (10 g/L, 1 g/L, 0.1 g/L, 0 g/L) vorbereitet und 100 µl der Verdünnungsstufen 10^1 , 10^2 und 10^4 auf den Agaroseplatten ausgestrichen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei 30 °C im Brutschrank für 24 Stunden, bis eine deutliche Koloniebildung zu erkennen war und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) bestimmt werden konnte.

2.5.3 Bakterieller Proliferationsassay mit *Escherichia coli*

Um eine Einschätzung der langfristigen Wirkung von Chitosan auf Bakterien abgeben zu können, eignete sich die Etablierung eines Proliferationsassays. In einem Schikanekolben wurden 10 mL CAMHB-Medium (mit 200 mM MES; pH 6.2) mit einer Kultur von *E. coli* K12 (498) inokuliert und bei 37 °C und 125 rpm im Schüttelinkubator über Nacht bis zur stationären Phase inkubiert. 50 mL frisches Medium auf 37 °C temperiert, erhielt die Beimpfung mit 1 mL dieser Vorkultur. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 125 rpm bis zu einer OD von 1 (bei 585 nm) und erfuhr eine Zellzahlbestimmung über eine Thoma-Zählkammer. Auf einer sterilen 96-Well Mikrotiterplatte standen 48 Wells für die Substanztests und Substanzkontrollen (der standardisierten Chitosane A [0.08], B [0.02], D [0.13], X [0.44] und Y [0.10], der Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin sowie von Natriumchlorid und Natriumacetat) mit jeweils 100 µl Testsubstanz für acht Verdünnungsstufen, sowie 12 Wells für die Positiv- und Negativkontrollen mit sterilem entsalztem Wasser entsprechend Abb. 9 zur Verfügung. Anschließend mussten diese Substanzen mit 100 µl zweifach konzentriertem CAMHB-Medium (mit 400 mM MES; pH 6.2) versetzt werden. Bei den Testsubstanzen konnten jeweils sechs Wells pro Konzentration angesetzt werden, wovon drei mit 10 µl Bakteriensuspension in einer Endkonzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL beimpft wurden (Substanztests). Den übrigen Wells fiel eine äquivalente Menge des einfach konzentrierten CAMHB-Mediums zu (Substanzkontrollen). Die Kontrollen umfassten bei jedem Testansatz sechs Replikate mit (= Positivkontrolle) und sechs Replikate ohne (= Negativkontrolle) Bakterien (siehe Abb. 9). Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 125 rpm. Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 und 72 Stunden sollte die Absorption bei 585 nm im Plate Reader *Wallac Victor 1420* bestimmt werden. Zusätzlich durchliefen die Wells eine Kontrolle des pH-Wertes nach 0, 24, 48 und 72 Stunden. Diese Wells standen der Berechnung zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens nicht weiter zur Verfügung. Die übrigen Messwerte gingen in die

statistische Auswertung in  ein (Abschnitt 2.6). Pro Substanz fand der Versuch mindestens drei Mal statt, um die Reproduzierbarkeit der Resultate zu gewährleisten.

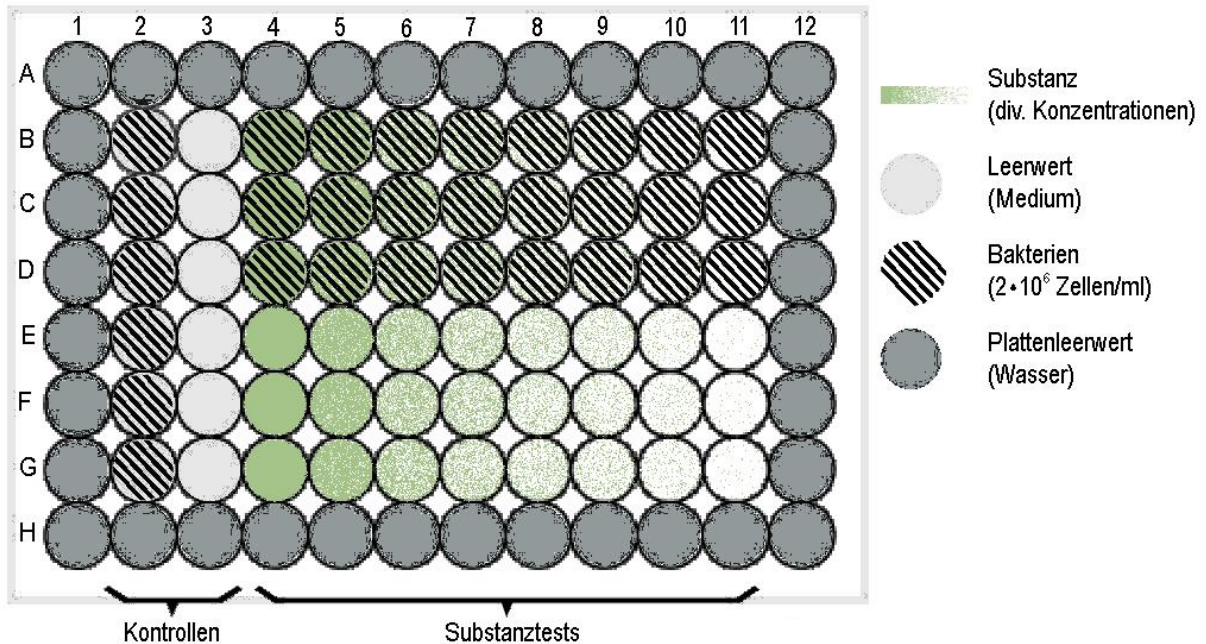


Abb. 9: Titerplatte des Proliferationsassays

Zur Untersuchung der Proliferation erfolgte die Belegung der 96-Well Titerplatte für jeden einzelnen Test gleich. Die gesamten äußeren Wells wurden mit Wasser gefüllt. Die zweite und dritte Reihe wurden mit den Kontrollen belegt, die zweite Reihe mit Medium und Bakterien und die dritte Reihe nur mit Medium. Die übrigen Reihen vier bis elf wurden mit der Testsubstanz in fallender Konzentration befüllt. Die Reihen B4 bis D11 wurden anschließend mit Bakterienkulturen beimpft und die Reihen E4 bis G11 mit einer äquivalenten Menge Medium. Am Ende waren alle Wells mit der gleichen Menge Flüssigkeit gefüllt und die Wells mit Bakterien enthielten eine äquivalente Zellzahl der Bakterien.

2.5.4 TEM Aufnahmen dotierter *Escherichia coli*-Bakterien

Parallel zu den Analysen der Proliferationsbedingungen (Abschnitt 2.5.3) war es möglich, die Veränderungen in der Zellstruktur, die das Chitosan D [0.13] bei dem gramnegativen Bakterium *E. coli* auslöst, über die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, steht auch für Transmissionselektronenmikroskop) zu visualisieren.

2.5.4.1 Zeitlicher Verlauf bei einer hohen Chitosankonzentration

Für die Vorbereitung der TEM Aufnahmen chitosanbehandelter Bakterienkulturen war es nötig, eine Vorkultur anzusetzen, wobei eine Kultur von *E. coli* K12 (DSM 30083) der Beimpfung von 10 mL LB-Medium (mit 200 mM Tris-Maleinsäurepuffer; pH 5.5) diente. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 100 rpm über Nacht im Wasserschüttelbad. Für die Versuchskultur wurden 5 mL LB-Medium (pH 5.5) mit 200 µl der Vorkultur angeimpft und drei Stunden bei 37 °C und 100 rpm kultiviert. Das aufgereinigte Chitosan D [0.13] musste

vorab 24 Stunden in dem Kulturmedium gelöst, autoklaviert und mit einer Endkonzentration von 10 g/L der Versuchskultur zugegeben werden. Die Probennahmen erfolgten nach 30 Minuten, weiteren 3 Stunden sowie nach 21 Stunden. Die Entnahme der Kontrollprobe (ohne Chitosan) aus der Versuchskultur vollzog sich unmittelbar vor der Inkubation mit Chitosan. In allen folgenden Schritten umfasste die Zentrifugation bei Raumtemperatur und 8000 rpm (sofern nicht anders angegeben) die Dauer von 2 Minuten in einer Eppendorf Zentrifuge 5415.

Die Primärfixierung wurde mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7.2) durchgeführt. Dazu mussten die entnommenen Proben zentrifugiert, der Überstand dekantiert und verworfen werden, gefolgt von der Aufnahme des Pellets in 1 mL 4 % Paraformaldehyd. Die Proben lagerten bis zur Sekundärfixierung bei 4 °C. Die Sekundärfixierung umfasst die Zentrifugation der vorfixierten Proben und die Resuspension des Pellets in einem Gemisch aus 2.5 % Glutaraldehyd und 0.1 M Cacodylat-Puffer (pH 7.2). Nach anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde wurden die Proben zentrifugiert und fünf Mal mit 0.1 M Cacodylatpuffer (pH 7.2) je fünf Minuten gewaschen. Bei der Tertiärfixierung fanden eine Zentrifugation der Proben und die Verwerfung des Überstands statt. Das Pellet wurde in 2 % Osmiumtetroxid resuspendiert und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation sollten die Proben fünf Mal mit entmineralisiertem Wasser je fünf Minuten gewaschen werden. Gefolgt von einer weiteren Zentrifugation und dem Dekantieren der Proben ergab sich die Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe. Die Pellets wurden dabei jeweils drei Mal 10 Minuten bei Raumtemperatur in 30, 50, 70, 90 und 96 % sowie drei Mal 15 Minuten in 100 % Ethanol aufgenommen. Die Proben durchliefen eine schrittweise Einbettung in Spurr Mixtur. Beginnend mit einer Mischung aus Spurr Mixtur (Epoxidharz) und Ethanol 100 % in einem Verhältnis von 1:3 wurde der Epoxidharzanteil bei jedem Schritt über 1:2; 1:1, 2:1 und 3:1 gesteigert. Der letzte Schritt der Einbettung (Verhältnis 3:1 aus Spurr Mixtur und 100 % Ethanol) erfolgte bei geöffnetem Deckel, um das Verdampfen des Ethanols zu beschleunigen. Daran anschließend wurden die Proben in reinem Epoxidharz resuspendiert. Die Infiltration der Proben fand hierbei zwei Mal für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rotator ebenfalls bei geöffnetem Deckel statt. Vorbereitend auf die Polymerisation mussten die Überstände mit einer Pipette entfernt und die Pellets in BEEM-Kapseln überführt werden. Größere Pellets sollten dafür vorab geteilt werden. Die Kapseln wurden mit Spurr Mixtur 100 % aufgefüllt.

Die Polymerisation dauerte im Trocknungsschrank U10 bei 70 °C ca. 12 Stunden. Im Folgenden härteten die polymerisierten Proben bei Raumtemperatur weiter nach. Manuell wurden Schnitte mit einer Schnittbreite von 90 nm angefertigt, die durch leichtes Bedampfen mit Chloroform geglättet und auf ein Grid übertragen werden konnten. Zur Nachkontrastierung verblieb das Grid unter Lichtausschluss für 30 Minuten auf einigen Tropfen 2 % Uranylacetat. Anschließend musste das Grid vor der weiteren Behandlung gründlich mit Wasser gespült werden. Die Kontrastierung erfolgte für 25 Minuten mit einigen Tropfen 2 % Reynolds Bleicitrat. Zum Schutz vor Reaktionen mit Kohlendioxid in den Reaktionsraum dienten einige Kaliumhydroxid-Pellets. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurde eine gründliche Reinigung des Grids mit Wasser mit anschließender Trocknung durchgeführt. Für die Aufnahme der Bilder stand ein *FEI Tecnai F20 STwin* Transmissionselektronenmikroskop mit einer Punktauflösung von 0.24 nm mit 200 kV im BF-TEM Modus bereit.

2.5.4.2 Serielle Aufnahmen bei unterschiedlichen Chitosankonzentrationen

Der Versuchsverlauf erfolgte äquivalent zum Abschnitt 2.5.4.1. Das Verfahren enthielt geringfügige Modifizierungen, um ausgeglichene Konditionen zu schaffen, was die Ablösung der Zellmembranen innerhalb des Präparationsprozesses minimierte. Zusätzlich kam abweichend von den vorangegangenen Versuchsbedingungen das LB-Medium mit einem pH-Wert von 6.0 (versetzt mit 200 mM Tris-Maleinsäurepuffer) und Chitosan D [0.13] in den Endkonzentrationen von 10 g/L, 1 g/L und 0.1 g/L zur Anwendung. Zur Kontrolle enthielt ein Kolben eine äquivalente Menge an Medium. Nach 0 Minuten, 30 Minuten, 3 Stunden und nach 24 Stunden fand eine Probenentnahme für die Aufbereitung zur TEM Analyse statt. Bis zur Sekundärfixierung entsprach der Versuchsablauf dem in Abschnitt 2.5.4.1 beschriebenen. Die anknüpfende Behandlung der Proben wird nur bei Abweichungen zu Abschnitt 2.5.4.1 näher erläutert.

Für die Sekundärfixierung kam es zur Resuspension des Pellets in 1 mL 2 % Glutaraldehyd/0.05 M Cacodylat-Puffer (pH 7.2). Die Proben lagerten bis zur Tertiärfixierung bei 4 °C. In der Tertiärfixierung wurden die Proben in 2 % Osmiumtetroxid/0.05 M Cacodylat-Puffer (pH 7.2) aufgenommen. Anschließend inkubierten die Proben 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der Waschschrift wurde mit Leitungswasser durchgeführt. Die Dehydratation der zentrifugierten und dekantierten Proben erfolgte jeweils zwei Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 30 %, 50 % und 70 % Ethanol und drei Mal mit 90 % und 96 % Ethanol. Bei den letzten drei Schritten mit 100 % Ethanol steigerte sich die Dauer auf 15 Minuten.

Die schrittweise Einbettung in Spurr Mixtur mit einer anschließenden Infiltration dauerte eine Stunde. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand durch Spurr Mixtur/Ethanol im Verhältnis 1:1 ersetzt und über Nacht infiltriert. Danach konnte der Epoxidharzanteil bei jedem Schritt (1 Stunde) über 2:1 und 3:1 gesteigert werden. Vor der Zugabe der 3:1 Mixtur wurde die Zentrifugation auf 3 Minuten und bei der anschließenden zweimaligen Resuspendierung in reinem Harz nochmals auf 4 Minuten erhöht. Das Nachhärten der auspolymerisierten Proben beanspruchte 2-3 Tage.

2.5.5 Beeinträchtigung der Dehydrogenaseaktivität von Bakterien

Weiterführend zur Messung der Proliferation kann über die Messung der Dehydrogenaseaktivität die Beeinträchtigung des Stoffwechsels von Bakterien überprüft werden. Bei intaktem Stoffwechsel wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ durch die Dehydrogenase metabolisiert. Im Testverfahren vollzieht sich die Umsetzung des Farbstoffs Resazurin (blau) über Resorufin (rosa) zu Dihydroresorufin (farblos), wodurch die Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden kann [Karakashev et al., 2003].

2.5.5.1 *Escherichia coli*

10 mL CAMHB-Medium (mit 200 mM MES; pH 6.2) wurden mit einer Kultur von *E. coli* K12 (DSM 498) beimpft und in einem Schikanekolben über Nacht bei 37 °C und 125 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. 1 mL dieser Vorkultur konnte in 50 mL frisches Medium übertragen werden und inkubierte in einem Schikanekolben bis zu einer optischen Dichte (OD) von 1. Für die anschließende Zellzahlbestimmung diente eine Zählkammer von Thoma. Eine sterile 96-Well Mikrotiterplatte bot Platz für 12 Wells mit 200 µl Medium (Kontrollen) und 48 Wells mit je 200 µl Testsubstanz in Kulturmedium. Als Testsubstanzen standen die standardisierten Chitosane A [0.08], B [0.02], D [0.13] und Y [0.10], die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin sowie Natriumchlorid und Natriumacetat zur Verfügung. Es wurden jeweils sechs Wells pro Testsubstanz mit Bakteriensuspension angesetzt, wovon im Weiteren nur je drei mit Farbstoff versetzt wurden. Die übrigen drei Wells dienten als Substanzkontrollen. Die Bakterien lagen mit einer Endkonzentration von $2.5 \cdot 10^8$ Zellen/mL in den Wells vor. Bei den Kontrollen ohne Bakterien (Negativkontrollen) reichte eine äquivalente Menge an Medium aus. Nach Hinzufügen der Bakterien erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei 37 °C und 125 rpm mit anschließender Zugabe von 75 µl des Resazurinfarbstoffes in Kaliumphosphatpuffer (0.5 g/L; pH 7.0) und weiteren 30 Minuten


Inkubation. Der Resazurinfarbstoff wurde zu der Hälfte der Wells hinzugegeben, so dass Positivkontrollen, Negativkontrollen und Substanztests jeweils mit und ohne Farbstoff vorlagen. Die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität fand im Plate Reader *Wallac Victor 2* bei 620 nm statt. Jede Substanz erforderte es, den Versuch mindestens drei Mal mit jeweils acht unterschiedlichen Substanzkonzentrationen durchzuführen. Nach Anwendung der Formel 2 auf die Werte gemessen bei 620 nm gingen die Ergebnisse in die Bestimmung der DW-Kurven (Abschnitt 2.6) ein.

Formel 2: Wachstumshemmung [%]

$$100 - \left[\frac{[x_M(KB^-F^+) - x_M(KB^-F^-)] - [(SB^+F^+) - x_M(SB^+F^-)]}{[x_M(KB^-F^+) - x_M(KB^-F^-)] - [x_M(KB^+F^+) - x_M(KB^+F^-)]} \right] \cdot 100$$

x_M : Mittelwert
 K: Kontrolle
 S: Substanz
 B⁺: mit Bakterien
 B⁻: ohne Bakterien
 F⁺: mit Farbstoff
 F⁻: ohne Farbstoff


2.5.5.2 *Bacillus subtilis*

Die Vorkultur von *B. subtilis* (DSM 10) wurde in 10 mL CAMHB-Medium (mit 200 mM MES; pH 6.2) angesetzt und über Nacht bei 30 °C und 125 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Sofern nicht abweichend vermerkt, erfolgte die Durchführung entsprechend den Angaben des Abschnitts 2.5.5.1. Nach dem Ansetzen der Versuchskultur wuchs *B. subtilis* bei 30 °C und 125 rpm bis zu einer Zellzahl von $> 1 \cdot 10^8$, was bei *B. subtilis* den Beginn der exponentiellen Phase kennzeichnet. Die Bakterien lagen mit einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^7$ Zellen/mL in den Wells vor. Nach Beendigung des Versuchs konnten die erhobenen Daten basierend auf Formel 2 verrechnet und in dem Programm  entsprechend den Angaben des Abschnitts 2.5.5.1 statistisch ausgewertet werden. Für die Normierung wurden jeweils die Kontrollen des eigenen Versuchsansatzes herangezogen, wobei die Abweichung der Kontrollen nicht mehr als 15 % betragen durfte. Alle Versuche wurden pro Substanz mindestens drei Mal ausgeführt.

2.5.6 Beeinträchtigung der Lumineszenz bei *Vibrio fischeri*

Das Bakterium *V. fischeri* ist als Symbiont im Meer beheimatet. Die erwartete Exposition mit Chitosan ist dort wahrscheinlicher und es verfügt über eine natürlich höhere Toleranz gegenüber Natriumchlorid, so dass die Wirkung auf dieses Bakterium ebenfalls untersucht werden sollte.

Leuchtbakterientests nach Dr. Lange mit *V. fischeri* wurden mit einer Variation des Puffersystems in Anlehnung an DIN/EN/ISO 11348-2 und DIN 38412-34 durchgeführt. 2 % Natriumchlorid in 20 mM MES (pH 6.3) ersetzte den Phosphatpuffer zur Stabilisierung des Systems. Als Testsubstanzen wurden die standardisierten Chitosane A [0.08], B [0.02], D [0.13], X [0.44] und Y [0.10], die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin sowie Natriumchlorid und Natriumacetat eingesetzt. Zur Äquilibrierung der Bakterienkonserve stand 12.5 mL auf 15 °C temperierte Reaktivierungslösung zur Verfügung. Es genügten 700 µl Reaktivierungslösung, um die Bakterien über 15 Minuten in Lösung zu bringen, bevor die restliche Reaktivierungslösung hinzugefügt wurde. Diese Bakteriensuspension ist ausreichend, um 20 Proben zu vermessen, was zwei Kontrollen (zufallsverteilt) sowie acht Verdünnungen der zu untersuchenden Substanz in einem doppelten Ansatz beinhaltet. Die Stammlösungen der Substanzen lagen in sterilem und entsalztem Wasser vor und wurden im Verhältnis 1:1 mit 4 % Natriumchlorid in 40 mM MES versetzt. Dies diente als Startkonzentration für eine Verdünnungsreihe mit je 700 µl Lösung pro Substanz in 2 % Natriumchlorid in 20 mM MES angefertigt. Von diesen Verdünnungen und der 2 % Natriumchlorid-Lösung in 20 mM MES als Kontrollsubstanz wurden je 700 µl in vorbereitete Küvetten in den Thermoblock *LUMIStherm* pipettiert. Je 500 µl der Bakteriensuspension standen in separaten Küvetten 15 Minuten bei 15 °C im Thermoblock. Alle weiteren Schritte mussten bei 15 °C im Thermoblock durchgeführt werden. Nach Ablauf der 15 Minuten fand nacheinander (in Abständen von 30 Sekunden) die Messung der relativen Leuchtleistungen der Küvetten mit Bakteriensuspension statt, woran sich direkt die Vermengung mit der temperierten Testsubstanz, beziehungsweise dem Puffer (Kontrolle), anschloss. Ab Beginn der ersten Messung dauerte die Inkubation der Küvetten exakt 30 Minuten. Daraufhin erfolgte eine erneute Bestimmung der relativen Leuchtleistung. Abschließend wurde der pH-Wert mittels einer Mikro-pH-Elektrode kontrolliert. Die Auswertung erfolgte nach bestehenden Gültigkeitskriterien der DIN 38412-34. Für die Berechnung wurden ausschließlich die Kontrollen herangezogen, die mit der Testsubstanz dem Test unterzogen wurden und deren Abweichung 3 % nicht überschritt. Pro Substanz beliefen sich die Wiederholungen der

Versuche auf drei Mal. Die Berechnung der Leuchtleistung und die Normierung auf die Kontrollen erfolgten unter Berücksichtigung der Formel 3 bis Formel 5, deren Ergebnisse in die Berechnung der DW-Kurven in dem Programm  (Abschnitt 2.6) eingingen.

Formel 3: Theoretische Lumineszenz (Lct)

$$Lct = L_{t0} \cdot fK$$

Formel 4: Korrekturfaktor (fK)

$$fK = \sum_{i=0}^4 (K_{i30}/K_{i0})$$

Formel 5: Hemmung der Lumineszenz [%]

$$= 100 \cdot \frac{Lct - Lt_{30}}{Lct}$$

L: Lumineszenz

t0: Zeitpunkt 0

t30: t0 + 30 Minuten

K: Kontrolle

2.5.7 Wachstum der Frondfläche von *Lemna minor*

Als Versuchsorganismus ist *L. minor* anspruchslos und ihr Wachstum ist keinen annuellen Schwankungen unterworfen. Gleichzeitig zählt *L. minor* zu den Pflanzenarten, die sensibel auf Umweltreize reagieren. Eine Analyse der Wirkung ist im Hinblick auf eine breitere Verwendung und Entsorgung bioverfügbaren Chitosans unbedingt zu berücksichtigen.

2.5.7.1 Wachstumshemmung im 7-Tage Experiment

Die Durchführung zur Bestimmung der Wachstumshemmung der Frondfläche von *L. minor* fand in Anlehnung an das Verfahren der DIN 38412 und DIN EN ISO 5667-16 statt. Verifiziert durch die Vorversuche konnte in allen Versuchsansätzen den Nährlösungen zur Herstellung der Vorkultur jeweils 35 mM MES und zur Herstellung des zweifach konzentrierten Mediums jeweils 70 mM MES zugefügt werden. Die standardisierten Testsubstanzen, Chitosan A [0.08], B [0.02], D [0.13], X [0.44] und Y [0.10], die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin sowie Natriumchlorid und Natriumacetat lagen in doppelt konzentrierter Lösung vor, die zu gleichen Teilen mit zweifach konzentriertem Nährmedium (mit 70 mM MES) vermischt und von denen 10 mL auf 6-Well Mikrotiterplatten übertragen wurden. Jeder Testdurchlauf umfasste jeweils drei Ansätze pro Verdünnungsstufe einer Substanz sowie sechs Ansätze für die Kontrollen mit sterilem

entsalztem Wasser. Pro Well reichte es aus, jeweils eine Pflanze mit drei Fronds einzusetzen. Alle verwendeten Pflanzen mussten dabei in vergleichbarer konstitutioneller Verfassung sein und in ähnlicher Größe vorliegen. Zu Beginn wurde mittels des Bildauswertesystems *Lemna Tec Scanalyser* die Größe der Frondfläche pro Well bestimmt und der pH-Wert gemessen. Die Testkulturen wuchsen anschließend bei 25 °C und 85 % Luftfeuchtigkeit in der Pflanzenzuchtkammer bei 125 µE/m² • s sieben Tage in den Testsubstanzen. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine erneute Bestimmung der Frondfläche sowie des pH-Wertes. Die Bestimmung bezog sich dabei ausschließlich auf die Fläche waagrecht zur Wasseroberfläche. Die Versuche wurden pro Substanz mindestens drei Mal wiederholt. Als Gültigkeitskriterium musste sich die Frondzahl nach sieben Tagen in den Kontrollen verachtfacht haben. Für die Validierung der Ergebnisse erfolgte die Normierung auf die Kontrollen desselben Versuchsansatzes. Die Ergebnisse gingen in die statistische Auswertung der DW-Kurven beschrieben in Abschnitt 2.6 ein. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, Veränderungen der Wuchsform mit dem Binokular *Olympus SZX12* zu dokumentieren.

2.5.7.2 Wachstumshemmung im *repeat dose* Experiment über vier Wochen

Die gesamte Vorgehensweise entsprach der angegebenen Methode (siehe oben). Im Gegensatz zu dem sieben Tage-Testverfahren wurde stattdessen nach sieben Tagen eine Pflanze (mit den besten konditionellen Eigenschaften) von einem Well in ein neues Well übertragen, welches dieselben Bedingungen (Substanzkonzentration) aufwies. Alle sieben Tage erfolgte die Bestimmung der Frondfläche gefolgt vom Umsetzen einer Pflanze pro Well in ein neues Well. Die gesamte Versuchsdauer belief sich auf vier Wochen. Dies wurde für die standardisierten Substanzen Chitosan A [0.08], Chitosan B [0.02] und Chitosan D [0.13] jeweils in drei Wiederholungen durchgeführt. Die Anpassung des gemischten Modells erfolgte entsprechend dem Abschnitt 2.6.4.

2.5.8 Viabilität der Zelllinie Hep G2 im LDH-Test

Die benötigte Zellzahl wurde in Kulturflaschen angezogen und durch Trypsinieren in frischem Kulturmedium auf eine Zellkulturplatte mit 24-Well übertragen. Für alle Ansätze belief sich die Anzahl der Zellen auf 200 000 pro Well, die nach der Aussaat für 24 Stunden äquilibrierten. Im Anschluss konnte das Kulturmedium entfernt und durch Inkubationspuffer (pH 7.4), beziehungsweise Testsubstanz in Inkubationspuffer, ersetzt werden. Als Testsubstanzen dienten die standardisierten Chitosane A [0.08], B [0.02], D [0.13]


und Y [0.10] sowie die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin und die Kontrollsubstanzen Natriumchlorid und Natriumacetat. Pro Titerplatte war es möglich, vier Verdünnungsstufen einer Testsubstanzen (à vier Replikate) und acht Kontrollen zu untersuchen. Nach 4 Stunden wurde die Testsubstanz abgezogen und die Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Inkubationspuffer mit 1 % Triton X-100 versetzt auf dem Schüttler *KS 125 basic* bei 300 rpm lysiert. Eine Probenentnahme erfolgte sowohl vor als auch nach der Lyse. Bis zur weiteren Verwendung (innerhalb von 4 Stunden) lagerten die Proben bei 4 °C. Jeder Versuch erforderte eine mehrfache Wiederholung.

In Anlehnung an Dringen und Mitarbeiter [Dringen et al., 1998] wurde zur Bestimmung der LDH-Aktivität 50 µl der Probe zusammen mit 130 µl des LDH-Puffers (pH 7.2) auf eine 96-Well Mikrotiterplatte übertragen. Jede Platte umfasste zur Kontrolle des Assays zusätzlich acht Leerwerte. 200 µl Reaktionsmix aus 80 mM Tris/HCl (pH 7.2), 0.2 M Natriumchlorid, 3.2 mM Brenztraubensäure-Natriumsalz und 0.4 mM NADH wurden jedem Well zugegeben und die Kinetik zur Absorptionsabnahme über elf Messungen alle 30 Sekunden bei 340 nm im *MRX Revelation Microplate Reader* bestimmt. Aus der entstehenden kinetischen Aufnahme diente der lineare Bereich für die Bestimmung der OD/min. Die spätere Normierung erfolgte ausschließlich auf die Kontrollen, die ebenfalls in dem Testansatz vorlagen. Da aufgrund der suboptimalen Löslichkeitsbedingungen durch den neutralen pH-Wert (>7) keine statistische Genauigkeit vorausgesetzt werden kann, erfolgte bei gleicher Konzentration und bei den Kontrollen eine Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen. Dem überwiegenden Teil der Ergebnisse liegt dabei mindestens ein Stichprobenumfang von vier Replikaten zugrunde, wohingegen die Kontrollen auf einem Stichprobenumfang von mindestens acht Replikaten basieren.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Werner Wosniok (Institut für Statistik der Universität Bremen) durchgeführt. Eine Korrelation zwischen antibakterieller Wirkung und Chitosankonzentration wurde bereits häufig demonstriert und konnte daher für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven vorausgesetzt werden [Anas et al., 2005].

Jedes Testsystem bedurfte eines angepassten Modells, welches die Daten am besten beschreiben konnte (Anhang 04 bis 08). Die Programmierungen erfolgten mit dem Programm

 2.15.3 der *R Foundation for Statistical Computing* [R Core Team, 2013].


2.6.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Alle Schätzungen der Konzentrations-Wirkungskurven beruhen auf dem Probitmodell (Formel 6). Dieses modelliert eine kontinuierliche Wirkung y in Abhängigkeit von einer Konzentration (oder Dosis) x durch eine skalierte Form der Normalverteilung:

Formel 6: Probitmodell

$$y = \min + (\max - \min) \cdot N(x; m, s) + \varepsilon$$

- min und max: Grenzen, in denen sich die Kurve bewegen kann
- x: Konzentration
- m: Konzentration, die mit dem Mittelwert von y verbunden ist
- s: Steigung der Kurve
- $N(x; m, s)$: Verteilungsfunktion der Normalverteilung
- ε : zufälliger Fehler mit Erwartungswert Null

Im Schätzverfahren wurden mit Hilfe des Newton-Raphson Algorithmus, einer Prozedur zur Optimierung nicht-linearer Modelle, iterativ die Koeffizienten \min , \max , m , s sowie deren Streuung für jeden Datensatz und damit die Gesamtkurve über die Minimierung der Summe der Abstandsquadrate an die Realdaten angepasst [Draper & Smith, 1966]. Im Rahmen von  erfolgte dies mittels der Funktion *nlm* [Schnabel et al., 1985]. Lag eine deutlich überkompensierte Reaktion (z.B. Steigerung des Wachstums bei Pflanzen) bei geringen Konzentrationen der eingesetzten Substanz vor (= Hormese), wurde diese Hormese durch eine Erweiterung des oben beschriebenen Modells berücksichtigt [Sauermost & Freudig, 1999; van Ewijk & Hoekstra, 1993]. Gleichzeitig war es nötig, in diesen Untersuchungen die Abhängigkeit der Kontrolle von der Konzentration x ebenfalls in Form einer Konzentrations-Wirkungskurve abzuschätzen. Diese trat bei dem Proliferationsassay mit *E. coli* und den siebentägigen Arealdominanztests mit *L. minor* ein. Beim Auftreten von Hormese wurde vermehrt auf die Abbildung der Hormese Wert gelegt und diese separat über eine Dichtefunktion additiv zum Verlauf der Wirkungskurve angenähert. Bei *L. minor* wurden der Hauptverlauf des Probitmodells und die Dichte zur Modellierung der Hormese unabhängig voneinander geschätzt und die Zusammenführung dieser Schätzungen erst später vorgenommen. Bei der Proliferationsbestimmung von *E. coli* wurde das Niveau des Sockels (Trübung der Substanz ohne Bakterien) ebenfalls in Abhängigkeit von der Konzentration geschätzt und in der Gesamt-Zusammenführung berücksichtigt. Alle Schätzungen von Modellkoeffizienten bedeuteten eine nichtlineare Optimierung, die stets Anfangswerte benötigt. Deswegen ging allen Schätzungen eine Anfangswertbestimmung für die

Koeffizienten ebenfalls unabhängig voneinander mit einem linearen Modell voraus. Eine Schätzung aller Einzelkomponenten des Gesamtmodells in einem einzigen Verfahren konnte aufgrund der Vielzahl der geschätzten Parameter nicht vorgenommen werden. Stattdessen erfolgte die Modellanpassung in drei bis vier Stufen, in denen die Funktionen für den Sockel (ausschließlich bei dem Proliferationsassay), der Hauptkurve und der Hormese getrennt geschätzt wurden und erst in der Endschätzung (Formel 7) zusammengeführt wurden.

Formel 7: Gesamtschätzung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit Hormese

$$y = k_0 + k_1 \cdot s(x) + k_2 \cdot (1 - S(x)) + g \cdot f(x) + \text{eps}$$

- y: Wirkung
- x: Konzentration
- s: Grundform des Sockels (Normalverteilungsfunktion)
- S: Grundform der Hauptkurve (Normalverteilungsfunktion)
- f: Grundform der Hormesekurve (Dichte einer Normalverteilung)
- k₀: Basis-Niveau
- k₁: Skalierungsfaktor des Sockels
- k₂: Skalierungsfaktor der Hauptkurve
- g: Skalierungsfaktor der Hormesekurve
- eps: zufälliger Fehler, mit Erwartungswert Null


Bei den übrigen Modellen, der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität und der Lumineszenz, konnten die beobachteten Werte ohne zusätzliche Schätzung entsprechend den angegebenen Formeln auf die Kontrollen normiert werden. Es musste keine Hormese modelliert werden, wodurch es möglich war, für jedes Einzelexperiment eine Kurve anzupassen und aus dem Verlauf der Einzelkurven die Gesamtkurve zu schätzen. Bei diesem Verfahren konnten die Abhängigkeiten der zugrunde liegenden Daten bei der Schätzung berücksichtigt werden, was sich verbreiternd auf das Konfidenzintervall der Gesamtkurve auswirkt und in gleicher Weise auf die Konfidenzintervalle der EC_{xx}. EC-Werte sind die Wiedergabe der effektiven Konzentration, die zu einem Effekt von xx % führt. Weil der Effekt im Wesentlichen mit steigender Konzentration fällt, sind alle Konzentrations-Wirkungsbeziehungen monoton fallend. Falls Hormese vorliegt, zeigt sich ein lokales Maximum am Beginn der Kurve, so dass die Kurve erst steigt und anschließend monoton fällt. Die Effekte sind aufgrund dessen positiv und nicht in Form ihrer hemmenden Wirkung dargestellt. Das heißt am Beispiel von *L. minor* ist die Arealdominanz und nicht die Wachstumshemmung der Bezugseffekt. Die Hemmung lässt sich jedoch immer aus der Bezugsgröße durch Subtrahieren ableiten (Effekt [100 %] – xx [%] = Hemmung [%]).

Eine 10 %ige Hemmung entspricht damit einer Arealdominanz von 90 % und somit dem EC_{90} -Wert. Aufgrund geringer Mengen an Chitosan X [0.44] und Y [0.10] beruhen die Kurvenschätzungen häufig auf zwei oder weniger Experimenten. Den übrigen Schätzungen der Kurven der Chitosane und Substanzkontrollen liegen mindestens drei Experimente zugrunde.



2.6.2 Konfidenzintervalle

Sofern die Konfidenzintervalle (KI) der Kurven sich nicht direkt aus der Schätzung per *nlm* ableiten ließen (Hesse-Matrix & Delta-Methode), wurden die Konfidenzintervalle über Monte-Carlo-Simulationen gewonnen, wobei Abstände zwischen simulierten Kurven nach Kolmogorow-Smirnow berechnet wurden, um das Konfidenzintervall für die gesamte Kurve zu gewinnen [Bishop et al., 1978; Lacorn et al., 2001].

2.6.3 Korrelationen

Um mögliche Korrelationen der EC-Werte mit den physikalisch-chemischen Parametern zu detektieren, wurden deren lineare Korrelation nach Pearson und ihre Rang-Korrelation nach Spearman mittels *cor.test* in  berechnet [Best & Roberts, 1975]. Für die effektiven Konzentrationen EC_{10} , EC_{50} und EC_{90} wurde zusätzlich eine PCA-Berechnung über das Programm *princomp* vorgenommen. Die Testergebnisse auf signifikante Korrelation wurden wegen der multiplen Tests nach dem Bonferroni-Ansatz korrigiert.

2.6.4 Lineares Gemischte-Effekte-Modell

Für den Nachweis einer Adaption des Pflanzenwachstums nach vier Wochen (Abschnitt 2.5.7.2) wurden für jedes Chitosan unterschiedliche Gemischte-Effekt-Modelle (*Linear mixed-effects model*) mittels *lme* in  angepasst und das optimale Modell über eine Anova bestimmt [Pinheiro & Bates, 2000]. Aus dem jeweils optimalen Modell wurde die Größe der biologischen Streuung, erkennbar an der Streuung des zufälligen Faktors, in den Niveaus der Individuen bestimmt und mittels eines optimalen Modells unter Einbeziehung der biologischen Streuung geprüft, ob über einen Zeitraum von vier Wochen eine Adaption stattgefunden hat und sich das Pflanzenwachstum signifikant verbessert oder verschlechtert hat. Das jeweils optimale Modell kann sich von Chitosan zu Chitosan unterscheiden (Anhang 09). Das umfangreichste Modell enthält alle möglichen Wechselwirkungen (Formel 8) und hat (in -Terminologie) die Gestalt:

Formel 8: Lineares Modell mit zwei- und dreifach Wechselwirkung
Dargestellt in \mathbb{R} -Terminologie

$$y \sim v \cdot k + k \cdot t + v \cdot t + v \cdot t \cdot k \quad \text{random} = \sim 1 | I$$

y: Bewuchs

v: Versuch

t: Zeit

k: Konzentration

I: Individuum

random: zufälliger Faktor für das Niveau eines Individuums

3 Ergebnisse

Zu Beginn wurden Chitosane zur antimikrobiellen Behandlung von Oberflächen untersucht, um sowohl die fungiziden als auch die bakteriziden Möglichkeiten genauer zu betrachten (Abschnitt 2.5.1 und 2.5.2). Da jedoch Zweifel an den Untersuchungsmethoden bestanden, wurden ausgiebigere Untersuchungen mit Chitosanen in Lösung durchgeführt. Hierbei wurden sowohl gramnegative (Abschnitt 3.3.1 bis 3.3.3 und 3.3.5) als auch grampositive (Abschnitt 3.3.4) Bakterien, sowie Eukaryoten (Abschnitt 3.4) berücksichtigt. In jedem Test wurde der pH-Wert regelmäßig kontrolliert, um konstante Bedingungen zu gewährleisten (Anhang 04, 07 und 08). Da Chitosane jedoch sehr variabel sind, erforderten diese Untersuchungen eine vereinheitlichte Vorbehandlung, Lösung und Lagerung der Chitosane (Abschnitt 3.1 und Anhang 01 bis 03). Darüber hinaus müssen insbesondere bakterielle Untersuchungen immer steril durchgeführt werden, was eine nähere Betrachtung des Verhaltens der Chitosane bei verschiedenen Sterilisationsmethoden (Abschnitt 3.1.1.2) erforderte. Hierfür sowie für die spätere Vergleichbarkeit und potentielle Zuordnung der Eigenschaften zu biologischen Effekten wurden von den verwendeten Chitosanen die physikalisch-chemischen Parameter festgehalten (Abschnitt 3.1.2).

3.1 Eigenschaften der Chitosane

3.1.1 Auswirkungen von Lagerung und Sterilisation

In Toxizitätstests ist besonders die Gewährleistung konstanter Bedingungen, z.B. in Bezug auf den pH-Wert und die Löslichkeit der zu untersuchenden Substanz, zu beachten. Durch die besondere Vielfalt, die der Gruppe der Chitosane als Biopolymere innewohnt, war daher die Verwendung einer Stammlösung unumgänglich. Hierdurch konnte weitestgehend sichergestellt werden, dass die zu untersuchende Testsubstanz immer dieselbe war, besonders in Bezug auf Molekulargewicht und Acetylierungsgrad, und damit Rückschlüsse auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften möglich waren. Als Voraussetzung musste zusätzlich eine zeitliche Stabilität der Chitosane in Lösung bestehen. Des Weiteren war steriles Arbeiten im Zusammenhang mit pro- oder eukaryotischen Testsystemen zwingend erforderlich, weshalb Kenntnisse darüber erlangt werden mussten, wie sich Chitosane unter bestimmten Sterilisierungsbedingungen verhalten (Anhang 01 und 02). Die Analysen der Stammlösung vor der Testdurchführung ergaben für Chitosan D [0.13] ein mittleres Molekulargewicht von 148 kg/mol sowie einen Acetylierungsgrad von 0.13 und eine Viskosität von 3.58 dl/g.

3.1.1.1 Einfluss von Temperaturen und Zeiten

In den Lagerungstests, die über 30 Tagen durchgeführt wurden, hatten sich im Vergleich zu dem jeweiligen Ausgangswert (Messung nach 0 Tagen) nur geringe Veränderungen im Molekulargewicht gezeigt (Abb. 10), die mit den Abweichungen der Ergebnisse vor Versuchsbeginn korrespondierten und somit innerhalb einer normalen Standardabweichung lagen.

Über den Zeitraum von 30 Tagen traten in allen Untersuchungen leichte Veränderungen im Molekulargewicht auf, sowohl in den in Essigsäure gelösten Chitosanen (HAc-Chitosane: Abb. 10 II) als auch in den in einfach destilliertem Wasser gelösten Chitosanen (dH₂O-Chitosane: Abb. 10 I). Generell zeigten sich jedoch die größten Abweichungen innerhalb der ersten 14 Tage. Nach weiteren 16 Tagen (entspricht der Messung nach 30 Tagen) wichen die gemessenen Werte weniger stark von den Ergebnissen nach 14 Tagen ab. Die geringsten Abweichungen traten überwiegend nach einem Tag auf (Abb. 10). Längere Lagerungen bewirkten stärkere Veränderungen des Molekulargewichts bzw. des Acetylierungsgrades. Ein bemerkenswert starker Abfall trat jedoch nicht generell in Abhängigkeit zur Lagerungsdauer auf, sondern konnte nur im Zusammenhang mit hohen Konzentrationen beobachtet werden. Chitosane gelöst in Wasser wiesen in der sehr hohen Konzentration von 10 g/L eine verstärkte Molekulargewichtsabnahme über die Zeit auf (Abb. 10 A bis D-I). Die übrigen Konzentrationen des dH₂O-Chitosans zeigten weniger starke Schwankungen des Molekulargewichts. Bei dem HAc-Chitosan zeigte die höchste untersuchte Konzentration von 10 g/L nur eine leicht verstärkte Tendenz zur Molekulargewichtsabnahme über die Zeit (Abb. 10 A bis D-II). Weitestgehend kam es zu einer deutlich geringeren Abnahme des Molekulargewichts über die Zeit als bei dem dH₂O-Chitosan. Überwiegend blieben die Lösungen stabil und zeigten mehr eine konzentrationsabhängige denn eine lösungsmittelabhängige Abnahme des Molekulargewichts. Die geringsten Schwankungen waren bei beiden Lösungsmitteln bei einer Temperatur von -20 °C zu erkennen.

In Bezug auf die Lagerungstemperatur ließ sich eine leichte Tendenz dahingehend erkennen, dass niedrigere Lagertemperaturen geringere Veränderungen unabhängig vom Lösungsmittel hervorriefen. Die geringsten Schwankungen des Molekulargewichts konnten bei einer Lagertemperatur von -20 °C ermittelt werden (Abb. 10 C-I und C-II).

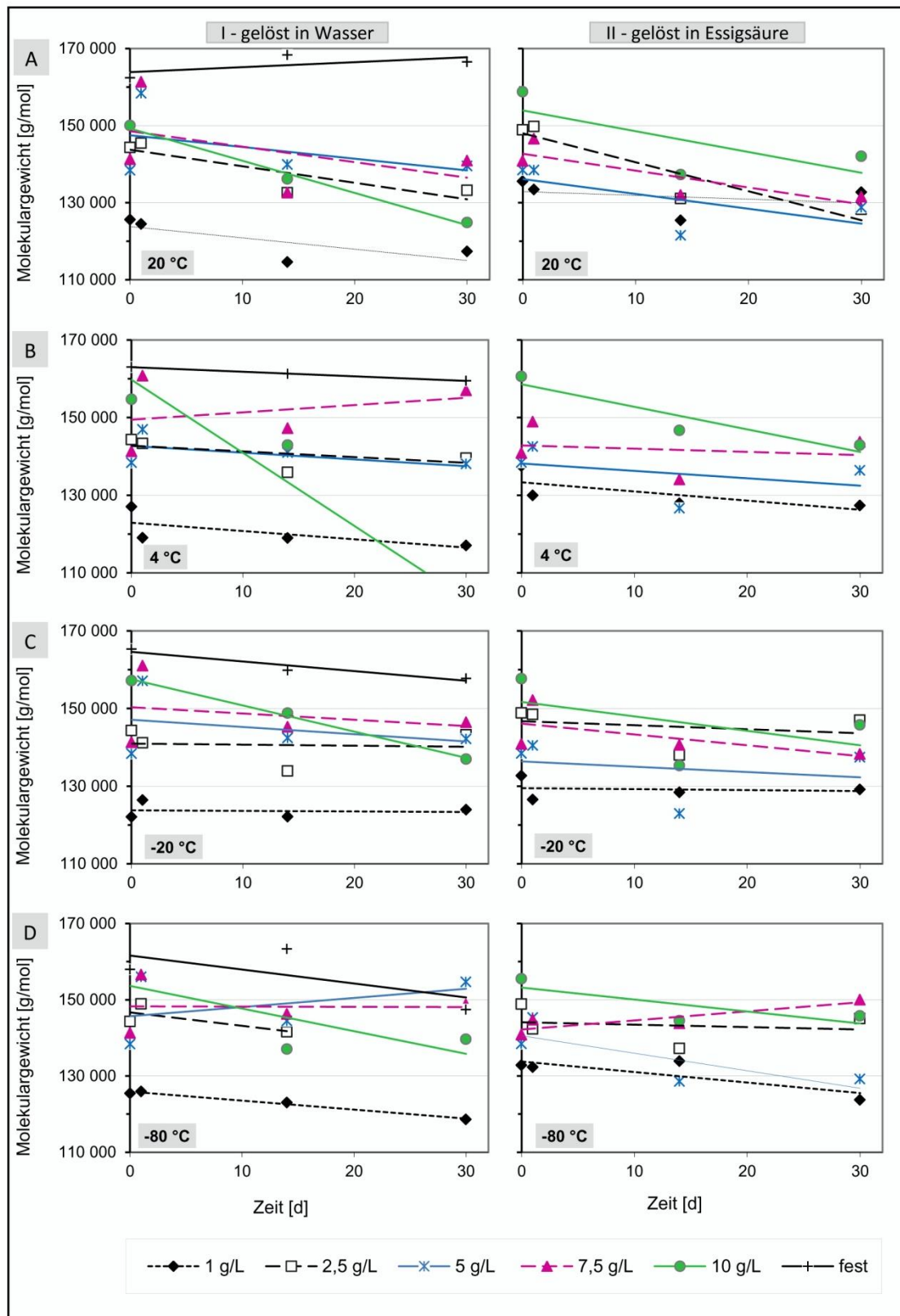


Abb. 10: Veränderung des Molekulargewichts durch variierende Lagertemperaturen

Veränderung des Molekulargewichts (M_w) über einen Zeitraum von 30 Tagen. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Chitosans D [0.13] (farblich markiert entsprechend der Legende) eingesetzt. Angegeben sind die Messdaten mit den jeweiligen Trendlinien. Chitosan D [0.13] wurde entweder in I: Wasser (linke Spalte) oder II: Essigsäure (rechte Spalte) gelöst, wobei sich beide Spalten auf dasselbe Molekulargewicht (Ordinate) beziehen. Zeilenweise wurden die Chitosane bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. A: 20 °C, B: 4 °C, C: -20 °C oder D: -80 °C (zusätzlich in der jeweiligen Graphik angegeben). Die Messungen erfolgten nach 0, 1, 14 und 30 Tagen. Der Feststoff wurde ausschließlich zur Analyse in 0.1 M Essigsäure gelöst.

3.1.1.2 Einfluss der Sterilisationsmethode

Die Behandlungen zur Sterilisation führten überwiegend zu einer Abnahme des Molekulargewichts und der Viskosität; geringer beeinträchtigt hingegen war der Acetylierungsgrad (Abb. 11). Chitosan, welches als Feststoff sterilisiert wurde, zeigte größere Veränderungen im Molekulargewicht und in der Viskosität im Vergleich zu den gelösten Chitosanen. Dies wurde auch durch die starken Schwankungen in der Wiederfindungsrate (siehe Anhang 02_01) bestätigt. Bei den gelösten Chitosanen zeigten, die in Essigsäure gelösten Ansätze, die stärkeren Abweichungen im Acetylierungsgrad, wobei die Werte des Acetylierungsgrades insgesamt nur in geringem Umfang beeinträchtigt wurden (Schwankungen bis 0.04 Einheiten).

Bei den Molekulargewichten unterlagen die Ansätze mit 10 g/L Chitosan in 0.1 M Essigsäure den stärksten Veränderungen, in Form einer Verringerung des Molekulargewichts. Dahingegen wies der Ansatz mit 1 g/L Chitosan gelöst in 0.1 M Essigsäure die geringsten Veränderungen auf. Ähnliche Ergebnisse brachte der Vergleich der Viskositäten. Auch hier unterlag der Ansatz mit 10 g/L Chitosan in 0.1 M Essigsäure den stärksten Veränderungen, gefolgt vom Ansatz mit 1 mg /mL Chitosan in einfach destilliertem Wasser. Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Sterilisationsmethoden war zu erkennen, dass die Trockensterilisation das Molekulargewicht und die Viskosität aller Chitosanansätze am stärksten verringerte, was in ausgeprägte Unterschiede zu den der Charakteristika der unbehandelten Chitosane führte. Generell rief das Autoklavieren jedoch die größte Variation hinsichtlich Viskosität und Molekulargewicht hervor, gefolgt von der fraktionierten Sterilisation. Es wurde außerdem deutlich, dass es zu einer unproportionalen Verschiebung der Molekulargewichte kam (Abb. 12). Im Vergleich zu der unbehandelten Probe (Abb. 12 grün dargestellt) zeigte die fraktioniert sterilisierte Probe (Abb. 12 schwarz dargestellt) eine Erhebung am Kurvenbeginn bei den höheren Molekulargewichten (Abb. 12 markiert durch einen Pfeil).

Die geringsten Veränderungen wurden durch UV-Bestrahlung oder Sterilfiltration ausgelöst. Die Acetylierungsgrade wurden durch die unterschiedlichen Verfahren der Sterilisation kaum beeinträchtigt. Der Ansatz mit 10 g/L Chitosan D [0.13] gelöst in Wasser zeigte eine leichte Abnahme des Acetylierungsgrades, hervorgerufen durch das Autoklavieren oder durch eine fraktionierte Sterilisation. Bei den übrigen Ansätzen war ein leichter Anstieg des Acetylierungsgrades durch die unterschiedlichen Sterilisationsmethoden zu verzeichnen.

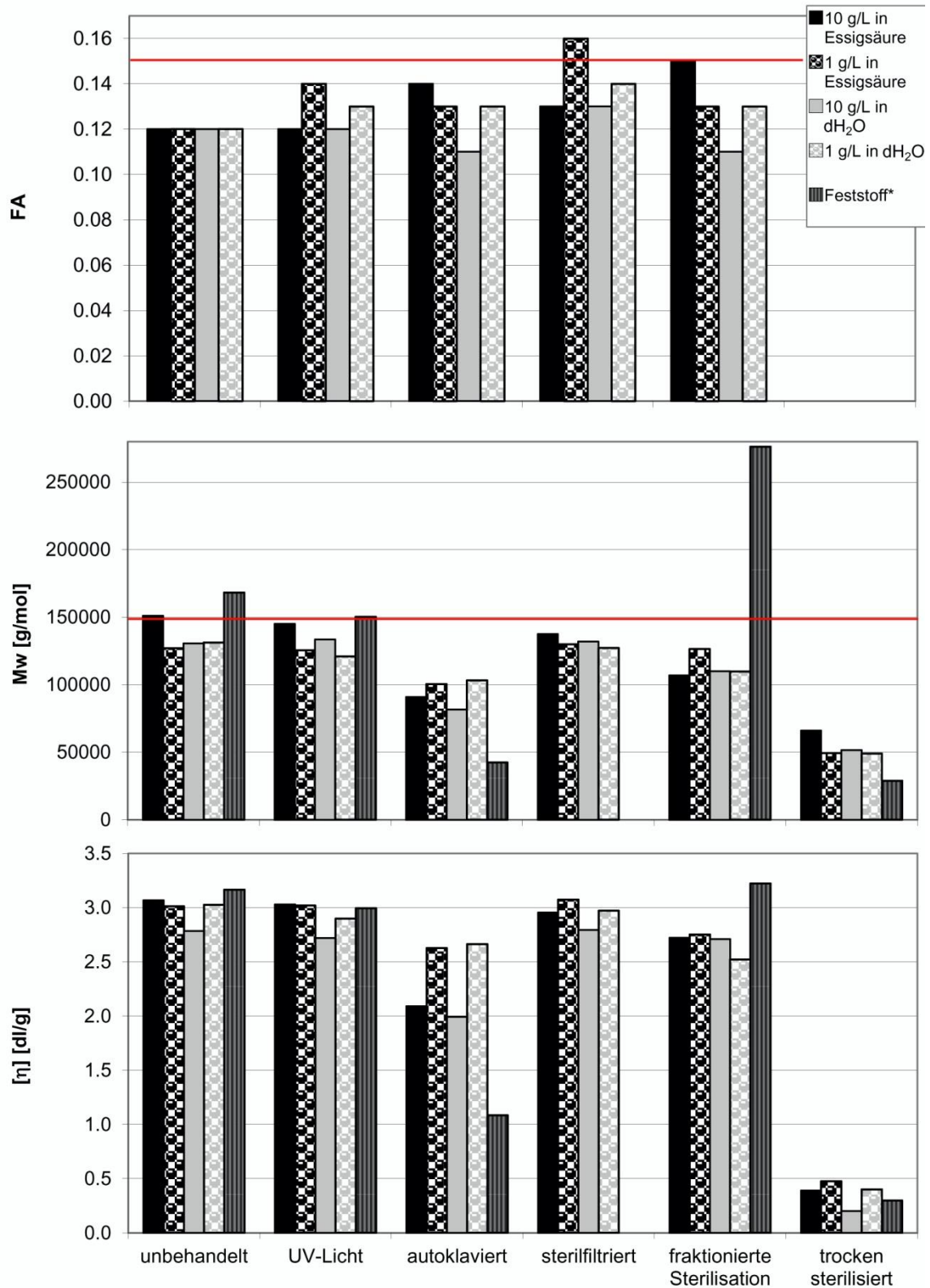


Abb. 11: Veränderung von F_A , M_w und $[\eta]$ durch verschiedene Sterilisationsmethoden

Jeweils zwei Chitosanproben (Chitosan D [0.13]) wurden in 0.1 M Essigsäure oder in einfach destilliertem Wasser (dH₂O) gelöst und sterilisiert. Die Veränderungen der Chitosanparameter F_A : Acetylierungsgrad, M_w : mittleres Molekulargewicht und $[\eta]$: intrinsische Viskosität wurden vor (= unbehandelt) und nach der jeweiligen Methode zur Sterilisation gemessen (spaltenweise angegeben auf der unteren Abszisse). Rote durchgezogene Linie entspricht dem mittleren Acetylierungsgrad und Molekulargewicht. Konzentrationen: schwarz: 10 g/L in Essigsäure, schwarz/weiß: 1 g/L in Essigsäure, grau: 10 g/L in einfach destilliertem Wasser, grau/weiß: 1 g/L in einfach destilliertem Wasser, schwarz gestreift: Feststoff für die Analyse gelöst in 0.1 M Essigsäure.

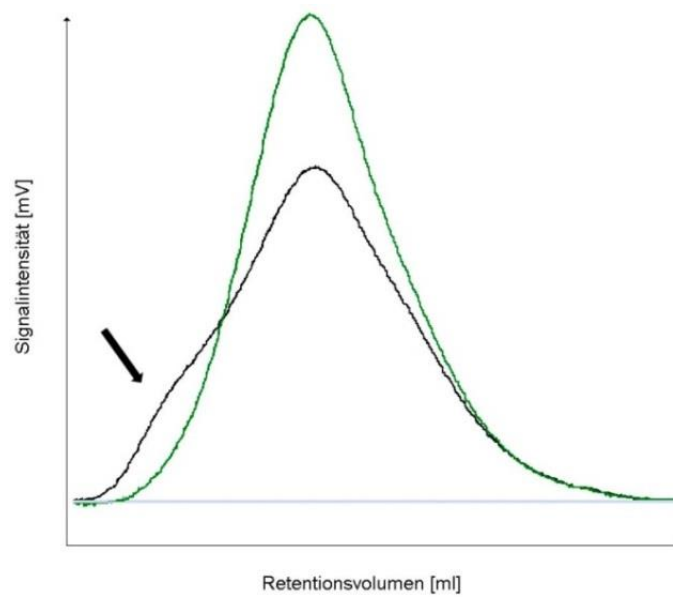


Abb. 12: Retentionsvolumen einer fraktioniert sterilisierten Chitosanprobe

Untersucht wurde Chitosan D [0.13] grün: vor (unbehandelte Probe) und schwarz: nach einer fraktionierten Sterilisation. Die Entstehung einer „Schulter“ in dem Signal der fraktioniert sterilisierten Probe ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

3.1.2 Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften

Auf Basis des Molekulargewichts vor der Löslichkeitsbehandlung (Tab. 5) wurde die benötigte Essigsäurekonzentration zur Lösung der Chitosane berechnet. Für alle Chitosane, außer Chitosan X [0.44], lag die benötigte Essigsäurekonzentration bei einem Einsatz von 1.5 mL Essigsäure auf 25 mg Chitosan zwischen 80 und 100 mM. Für Chitosan X [0.44] ergab die Berechnung eine Konzentration von 40 mM. Die tatsächlich eingesetzte Essigsäurekonzentration für die Standardisierung der Chitosane in der Löslichkeitsbehandlung wurde folglich auf 0.1 M festgelegt und umfasste damit alle benötigten Essigsäurekonzentrationen der eingesetzten Chitosane. Zudem entsprach diese Molarität der Essigsäure den Vorgaben der Chitin Society für die Lösung von Chitosanen [Roberts, 2007].

Die Chitosane wurden in Zusammenarbeit mit der analytischen Abteilung des UFT untersucht und die möglichen Parameter erfasst (Tab. 4 und Tab. 5). Es handelte sich dabei ausschließlich um α -Chitosan.

Tab. 4: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Chitosane

Aufgeführt sind die selbst erfassten physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Chitosane [Weinhold et al., 2009]. F_A : Acetylierungsgrad nach Hirai, P_A : Muster der Acetylierung, D_p : Polymerisationsgrad.

| Chitosan | F_A (Hirai) | P_A | D_p | Deacetylierte Einheiten [$D_p \cdot (1 - F_A)$] | Chloridgehalt [mg/10 g Chitosan] | Protein |
|------------|---------------|-------|--------|---|--|---------|
| Chitosan A | 0.08 | 0.79 | 721.40 | 663.69 | 1492.00 | 0.68 |
| Chitosan B | 0.02 | 0.46 | 601.73 | 589.69 | 1559.00 | 0.76 |
| Chitosan D | 0.13 | 0.96 | 851.56 | 740.86 | 1359.00 | 0.68 |
| Chitosan X | 0.44 | 1.12 | 196.89 | 110.26 | 15.00 | 0.76 |
| Chitosan Y | 0.10 | 0.95 | 238.70 | 214.83 | 6.00 | 1.45 |

Abweichungen ergaben sich bei den Untersuchungen der Eigenschaften von unmodifizierten zu standardisierten Chitosanen. Aus diesem Grund wurde die Analyse für unmodifizierte Chitosane (Tab. 5) durchgeführt und im Anschluss an die Löslichkeitsbehandlung wurden diese wiederholt (Tab. 6) charakterisiert. Beim Vergleich der Charakteristika vor und nach der Löslichkeitsbehandlung zeigte sich außer bei Chitosan B [0.02] und D [0.13] ein tendenzieller Anstieg des Molekulargewichts, was nicht für die intrinsische Viskosität zutrifft. Die Polydispersität stieg in allen untersuchten Proben. Bei Chitosan A [0.08] führte die Vorbehandlung zum Anstieg aller Parameter. Die übrigen Chitosane zeigten sowohl additive als auch destruktive Veränderungen der Parameter.

Tab. 5: Chitosane vor der standardisierten Löslichkeitsbehandlung

Physikalisch-chemische Parameter der verwendeten Chitosane vor dem Standardisierungsverfahren. M_w : mittleres Molekulargewicht, M_n : medianes Molekulargewicht, PD: Polydispersität, $[\eta]$: intrinsische Viskosität, Rh: hydrodynamischer Radius, M-H: Mark-Houwink Konstante, F_A : Acetylierungsgrad.

| Chitosan | M_w [kg/mol] | M_n [kg/mol] | PD [M_w / M_n] | $[\eta]$ [dl/g] | Rh [nm] | M-H | $M_w \cdot (1 - F_A)$ |
|------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|------------|------|-----------------------|
| Chitosan A | 122.00 | 53.19 | 2.32 | 3.19 | 16.89 | 0.74 | 112.24 |
| Chitosan B | 98.05 | 56.44 | 1.76 | 2.94 | 15.79 | 0.79 | 96.09 |
| Chitosan D | 148.69 | 61.63 | 2.41 | 3.58 | 18.66 | 0.72 | 129.36 |
| Chitosan X | 43.06 | 24.58 | 1.75 | 1.39 | 9.34 | 0.84 | 24.11 |
| Chitosan Y | 40.88 | 22.17 | 1.85 | 1.33 | 9.04 | 0.86 | 36.79 |

Tab. 6: Chitosane nach der standardisierten Löslichkeitsbehandlung

Physikalisch-chemische Parameter der verwendeten standardisierten Chitosane. M_w : mittleres Molekulargewicht, M_n : medianes Molekulargewicht, PD: Polydispersität, $[\eta]$: intrinsische Viskosität, Rh: hydrodynamischer Radius, M-H: Mark-Houwink Konstante, F_A : Acetylierungsgrad.

| Chitosan | M_w [kg/mol] | M_n [kg/mol] | PD [M_w/M_n] | $[\eta]$ [dl/g] | Rh [nm] | M-H | $M_w \cdot (1-F_A)$ | Essigsäure- konzentration [mM] pro g/L Chitosan |
|------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|------------|------|---------------------|--|
| Chitosan A | 156.99 | 63.55 | 2.60 | 3.52 | 19.24 | 0.66 | 144.43 | 1.69 ± 1.24 |
| Chitosan B | 86.28 | 36.86 | 2.40 | 2.37 | 13.86 | 0.71 | 84.55 | 1.02 ± 0.96 |
| Chitosan D | 96.58 | 27.15 | 3.80 | 2.38 | 14.02 | 0.67 | 84.02 | 1.17 ± 0.96 |
| Chitosan X | 45.68 | 11.17 | 4.10 | 1.40 | 9.25 | N.A. | 25.58 | N.A. |
| Chitosan Y | 55.27 | 23.20 | 2.40 | 1.18 | 9.35 | 0.58 | 49.74 | 2.57 ± 0.31 |

Die Molekulargewichte der Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin lagen nach den Herstellerangaben mit 215.64 und 221.21 g/mol dicht beieinander (Tab. 7). Die Monomere wurden derselben Löslichkeitsbehandlung unterzogen, allerdings konnten die Molekulargewichte und die zugehörigen Charakteristika nach der Löslichkeitsbehandlung aufgrund der geringen Größe nicht analysiert werden. Da es sich bei den Monomeren jedoch um Reinsubstanzen handelte, die nicht über eine vergleichbare Kettenstruktur wie die Chitosane verfügen, war nicht von einer Degradation auszugehen. Somit konnte eine Stabilisierung der Lösungsbedingungen verbunden mit der Vergleichbarkeit der Chitosane und Monomere untereinander gewährleistet werden. Allerdings entstanden durchschnittlich 10 % Verlust durch die Löslichkeitsbehandlung bei den Chitosanen (Wiederfindungsraten ca. 90 %). Nur für Chitosan Y [0.10] lag die Wiederfindungsrate mit 63 % bei einem Drittel Materialverlust.

Die Ergebnisse der GC-Messung zur Detektion der Essigsäurekonzentration nach der Löslichkeitsbehandlung (Tab. 6 und Tab. 7) ließen erkennen, dass die Chitosane A [0.08], B [0.02] und D [0.13], ebenso wie die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin, eine Essigsäurekonzentration unterhalb von 2 mM Essigsäure auf 1 g/L Substanz aufwiesen. Bei Glucosamin ergab die Ermittlung der Essigsäurekonzentration 1.27 mM und bei N-Acetylglucosamin 0.79 mM (Tab. 7) für ein Volumen von 1 g/L Substanz. Ausschließlich Chitosan Y [0.10] zeigte leicht höhere Essigsäurekonzentrationen von 2.6 mM auf 1 g/L Substanz. Gleichzeitig lag einzig bei Chitosan Y [0.10] die Standardabweichung unter 15 %

(Tab. 6). Bei den übrigen Chitosanen und Monomeren lag die Standardabweichung mit bis zu 94 % deutlich höher, da sich die gemessenen Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze befanden (siehe Anhang 03_05). Unter Berücksichtigung der Standardabweichung lag die Essigsäurekonzentration aller Chitosane unterhalb 3 mM für 1 mg Chitosan in 1 mL Lösung.

Tab. 7: Charakteristika der Monomere und Substanzkontrollen

Die Essigsäurekonzentration ist bezogen auf ein Volumen von 1 g/L bei den Monomeren Glucosamin und N-Acetylglucosamin und 1 M bei den Substanzkontrollen Natriumchlorid und Natriumacetat.

| Substanz | M _w [g/mol] | ermittelte Essigsäurekonzentration [mM] |
|--------------------|------------------------|---|
| Glucosamin | 215.64 | 1.27 ± 0.93 |
| N-Acetylglucosamin | 221.21 | 0.79 ± 0.25 |
| Natriumchlorid | 58.44 | 1.51 ± 0.77 |
| Natriumacetat | 82.03 | 2.80 ± 1.06 |

Die GC-Messungen der Essigsäurekonzentrationen der Substanzkontrollen Natriumchlorid und Natriumacetat ergaben 1.51 mM für Natriumchlorid und 2.8 mM für Natriumacetat bei einem Volumen von 1 M. Die Vergleichbarkeit der Chitosane, Monomere und Substanzkontrollen bezüglich der Essigsäurekonzentration konnte durch die Löslichkeitsbehandlung ebenfalls gewährleistet werden.

Für einen vollständigen Vergleich innerhalb der Korrelationsstudien wurden weitere physikalisch-chemische Eigenschaften berechnet, wie die Anzahl der Aminogruppen bezogen auf den Polymerisationsgrad oder das Molekulargewicht (Tab. 4 und Tab. 6).

Tab. 8: Schwermetallbelastung der Chitosane A [0.08], B [0.02] und D [0.13]

Angegeben wurden die untersuchten Schwermetalle in µg/L mit der relativen Standardabweichung (RSD)

| Element | Chitosan A | | Chitosan B | | Chitosan D | |
|---------|------------|------|------------|-------|------------|------|
| | RSD | | RSD | | RSD | |
| | µg/L | [%] | µg/L | [%] | µg/L | [%] |
| Arsen | 0.055 | 7.08 | 0.029 | 11.15 | 0.490 | 3.10 |
| Blei | 0.616 | 1.29 | 3.339 | 1.10 | 1.742 | 0.65 |
| Cadmium | 0.025 | 4.46 | 0.004 | 6.61 | 0.060 | 1.80 |
| Chrom | 8.473 | 3.10 | 2.855 | 2.61 | 12.514 | 1.90 |
| Kobalt | 0.060 | 4.65 | 0.024 | 4.84 | 0.106 | 3.14 |
| Kupfer | 2.469 | 2.74 | 0.130 | 3.10 | 1.586 | 1.78 |
| Nickel | 1.987 | 2.98 | 0.100 | 4.16 | 5.534 | 1.82 |
| Uranium | 0.225 | 1.67 | 0.012 | 2.15 | 0.141 | 2.41 |
| Zink | 7.994 | 2.76 | 0.772 | 2.52 | 6.411 | 1.96 |

Für die Chitosane A [0.08], B [0.02] und D [0.13] wurden darüber hinaus der Gehalt einiger Schwermetalle bestimmt (Tab. 8). Dabei war auffällig, dass Chitosan D [0.13] überwiegend die höchsten Schwermetallkonzentrationen aufwies, gefolgt von Chitosan A [0.08]. Chitosan D [0.13] zeigt zudem einen erhöhten Kobalt-Gehalt. Mit Ausnahme von Blei waren bei Chitosan B [0.02] die geringsten Schwermetallkonzentrationen zu finden.

Zusammenfassung der Eigenschaften der Chitosane

Lagerungsbedingte Veränderungen des Molekulargewichts traten nur in geringem Umfang bei sehr hohen Konzentrationen von 10 g/L auf. Die geringsten Beeinträchtigungen des Molekulargewichts traten bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C auf. Beim Vergleich der Sterilisationsmethoden ergaben sich die geringsten Abweichungen der dargestellten Charakteristika bei der Sterilfiltration von 10 g/L Chitosan gelöst in einfach destilliertem Wasser.

Für die Löslichkeitsbehandlung wurde 0.1 M Essigsäure verwendet. Dieses stabilisierte das Löslichkeitsverhalten von Chitosan, hatte allerdings Einfluss auf die Charakteristika und führte zu einer breiteren Molekulargewichtsverteilung. Allerdings bewirkte die Lyophilisierung eine durchgängig geringe freie Essigsäurekonzentration nach der Löslichkeitsbehandlung von weniger als 3 mM. Die Schwermetallkonzentration der untersuchten Chitosane zeigte eine niedrige Belastung, mit Ausnahme einer geringfügigen Überschreitung der Richt- und Grenzwerte des Kobalt-Gehaltes bei Chitosan D [0.13].

3.2 Chitosan als Oberflächenbehandlung

3.2.1 Chitosan-induzierte Hemmung der Sporenceimung und des Pilzwachstums

Nach einer Inkubation von vier Wochen kam es zur Sporenceimung. Entsprechend der Beobachtung erfolgte eine numerische Bewertung (Tab. 9) des Objektträgers nach festgelegten Kriterien (Abschnitt 2.5.1).

Tab. 9: Numerische Bewertung des Hemmtests mit Schimmelpilzen

Der Test wurde nach den Vorgaben des Standardtests DIN ISO 846 vorgenommen (Abschnitt 2.5.1). Es wurden pro Chitosan zwei Platten mit Glucoseagar und zwei Platten mit Mineralagar begutachtet und bewertet.

1: kein Wachstum mikroskopisch erkennbar, 2: kein Wachstum mit bloßem Auge erkennbar, 3: bis zu 25 % der Oberfläche ist bewachsen, 4: bis zu 50 % der Oberfläche ist bewachsen, 5: über 50 % der Oberfläche ist bewachsen, 6: gesamte Probenoberfläche ist bewachsen.

| Ansatz | Glucoseagar | | Mineralagar | |
|-------------------|-------------|----|-------------|----|
| | I | II | III | IV |
| Kontrolle | 4 | 5 | 0 | 0 |
| Chitosan D | 4 | 4 | 2 | 2 |
| Chitosan X | 4 | 5 | 2 | 3 |
| Chitosan Y | 2 | 2 | 0 | 2 |

Es wurde eingangs eine Sporen-Mischung mit 10^6 Sporen/ml aus Sporen von *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces variotii*, *Gliocladium virens* und *Chaetomium globosum* verwendet, die auf alle Platten gleichermaßen verteilt wurde. Dennoch waren die Platten unterschiedlich dicht und auch mit einer unterschiedlichen Ausprägung der Arten bewachsen. Der Bewuchs wird in Abb. 13 an den Beispielen von Chitosan D [0.13], X [0.44] und Y [0.10] dargestellt. Auf dem Glucoseagar (Abb. 13 A-D) war der Bereich um den Objektträger gleichmäßig gut bewachsen. Bei der Kontrolle kam es zu einer Ausbreitung des Pilzmycels auf dem Objektträger (Abb. 13 A-II). Die Objektträger von Chitosan D [0.13] und Chitosan X [0.44] (Abb. 13 B-II und C-II) wiesen ebenfalls einen deutlichen Bewuchs mit Myzel auf.

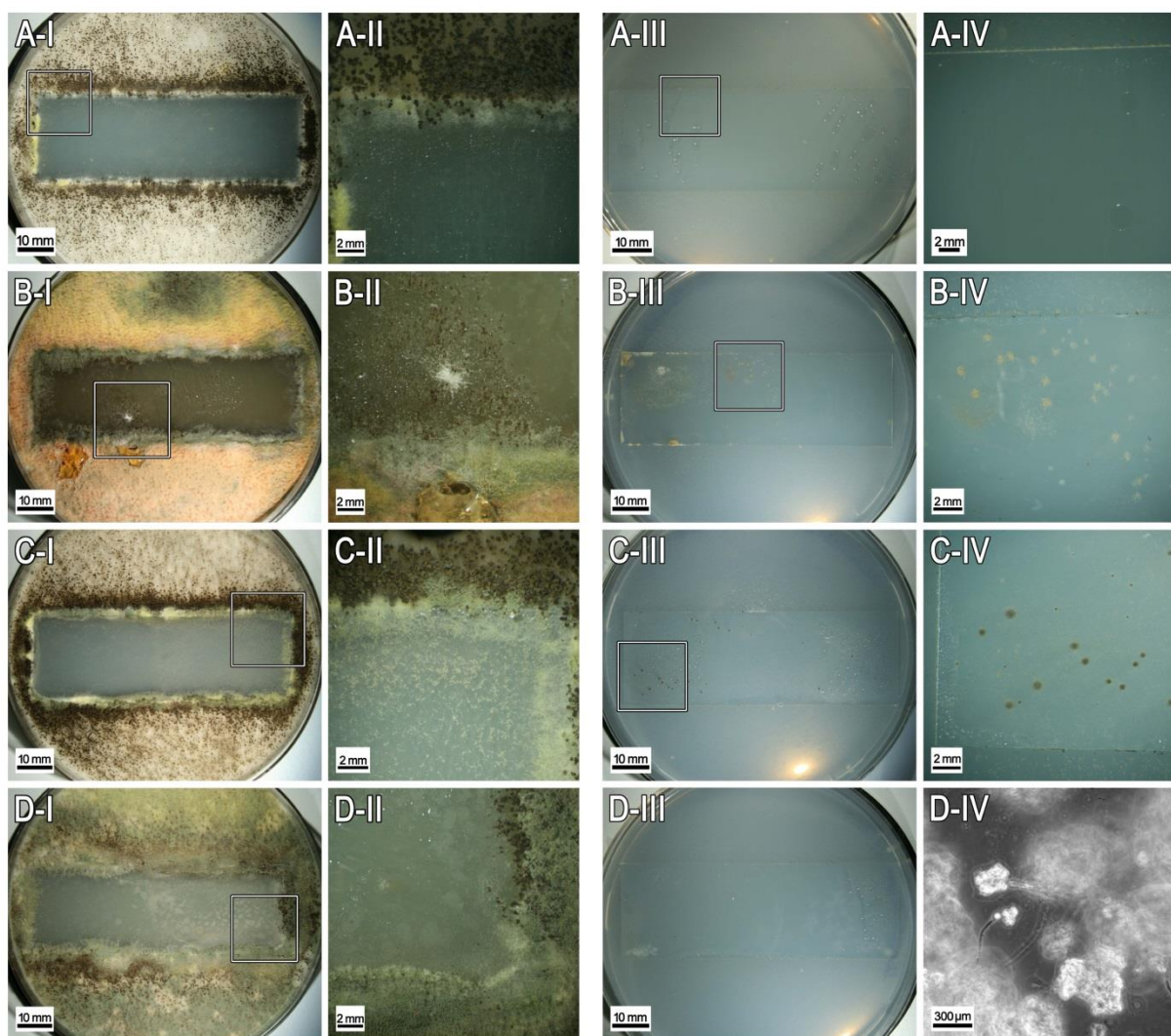


Abb. 13: Schimmelpilzbewuchs chitosanbehandelter Objektträger

Chitosanbeschichtete Objektträger wurden entsprechend dem Hemmtest nach DIN ISO 846 auf Agaroseplatten platziert. Die Pilzsporen wuchsen 4 Wochen auf Glucoseagar (I und II) oder Mineralagar (III und IV), wobei immer eine Aufnahme der gesamten Platte (I und III) und eine Detailaufnahme (II und IV) angefertigt wurden. Die Positionen der Detailaufnahmen sind in den Übersichten markiert mit Ausnahme von D-III, da es sich bei D-IV um eine mikroskopische Detailansicht handelt. A: Kontrollgruppe mit einem unbehandelten Objektträger, B: Objektträger ist mit Chitosan D [0.13] beschichtet, C: Objektträger ist mit Chitosan X [0.44] beschichtet, D: Objektträger ist mit Chitosan Y [0.10] beschichtet.

Bei Chitosan Y [0.10] (Abb. 13 D-II) fiel die Sporenceimung auf dem Objektträger deutlich geringer aus. Auf dem Mineralagar (Abb. 13 III und IV) war bei der Kontrolle kein Bewuchs zu verzeichnen (Abb. 13 A-III bis A-IV), wohingegen die Objektträger von Chitosan D [0.13] und Chitosan X [0.44] deutlich bewachsen waren (Abb. 13 B-III bis B-IV und C-III bis C-IV). Bei Chitosan Y [0.10] war mit bloßem Auge kein Bewuchs zu erkennen (Abb. 13 D-III), unter dem Mikroskop waren jedoch vereinzelt Hyphen vorhanden (Abb. 13 D-IV).

Zusammenfassung der chitosaninduzierten Hemmung der Sporenceimung und des Pilzwachstums

Die untersuchten Chitosane wurden von den eingesetzten Pilzen bewachsen. Das Wachstum fiel teilweise stärker aus, als bei den Kontrollen ohne Chitosan. Ausschließlich Chitosan Y [0.10] mit einem geringen Molekulargewicht und einem hohen Acetylierungsgrad bewirkte einen verminderten Bewuchs durch Pilzmyzel sowohl auf Glucose- als auch auf Mineralagar.

3.2.2 Inhibition der Koloniebildung von *Escherichia coli* auf Agaroseplatten

Nach der Inkubation von 24 Stunden war bei einer Chitosankonzentration von 10 g/L durchweg kein Wachstum zu verzeichnen. Bei Chitosankonzentrationen von 1 g/L konnten $3.85 \cdot 10^7$ CFU/ml, bei 0.1 g/L $3.76 \cdot 10^7$ CFU/mL und bei den Kontrollen ohne Chitosan $3.02 \cdot 10^7$ CFU/mL im Mittel ausgezählt werden.

Zusammenfassung der Inhibition der Koloniebildung von *E. coli*

Erst in hohen Chitosankonzentrationen von 10 g/L konnte ein Rückgang des oberflächlichen Bewuchses durch *E. coli* festgestellt werden.

3.3 Antibakterielle Wirkung gelöster Chitosane

Zu Beginn wurde die Verwendung von Mineralmedien für definierte Versuchsbedingungen favorisiert, allerdings kam es im Zusammenhang mit einigen essentiellen Bestandteilen des ausgewählten Glucose-Mineralmediums (Magnesiumsulfat, Dinatriumhydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Trikaliumphosphat und Natriumpyrophosphat) zu Präzipitationen beim Einsatz von Chitosan. Auch eine Senkung des pH-Wertes < 6 brachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse, was die Sondierung alternativer Medien notwendig machte. Der Einsatz von Komplexmedien erschien erfolgversprechender, da es bei niedrigeren pH-Werten (< 6.3) zu keinem Ausflocken des Chitosans kam. Unterschiedliche Komplexmedien, darunter DSM-Medium 1, LB-Medium und CAMHB-Medium wurden getestet. Das CAMHB-Medium erwies sich als am besten geeignet und wurde nachfolgend ausschließlich für die Testsysteme zur antibakteriellen Untersuchung von

Chitosan verwendet. Zur Stabilisierung des pH-Wertes im laufenden System wurden verschiedene Puffer eingesetzt (Citrat-Phosphat-Puffer, Acetat-Puffer, Tris-Maleinsäurepuffer, MES). Mit Phosphat kombinierte Puffer führten zu Ausfällungen des Chitosans. Aus den Vorversuchen resultierte, dass Tris-Maleinsäurepuffer und MES-Puffer weitere Präzipitationen verhinderten. Der Tris-Maleinsäurepuffer erzeugte ein besseres bakterielles Wachstum, der MES-Puffer stabilisierte jedoch deutlich zuverlässiger den pH-Wert (Daten nicht gezeigt), so dass der MES-Puffer in den folgenden Tests (Abschnitte 3.3.1, 3.3.3 bis 3.3.5, 3.4.1 und 3.4.2) eingesetzt wurde.

3.3.1 Einfluss auf die Proliferation von *Escherichia coli*

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurden für jeden Zeitpunkt (0-72 Stunden) separat aufgenommen (Zeitintervalle siehe Abschnitt 2.5.3) und der zugehörige Kurvenverlauf geschätzt.

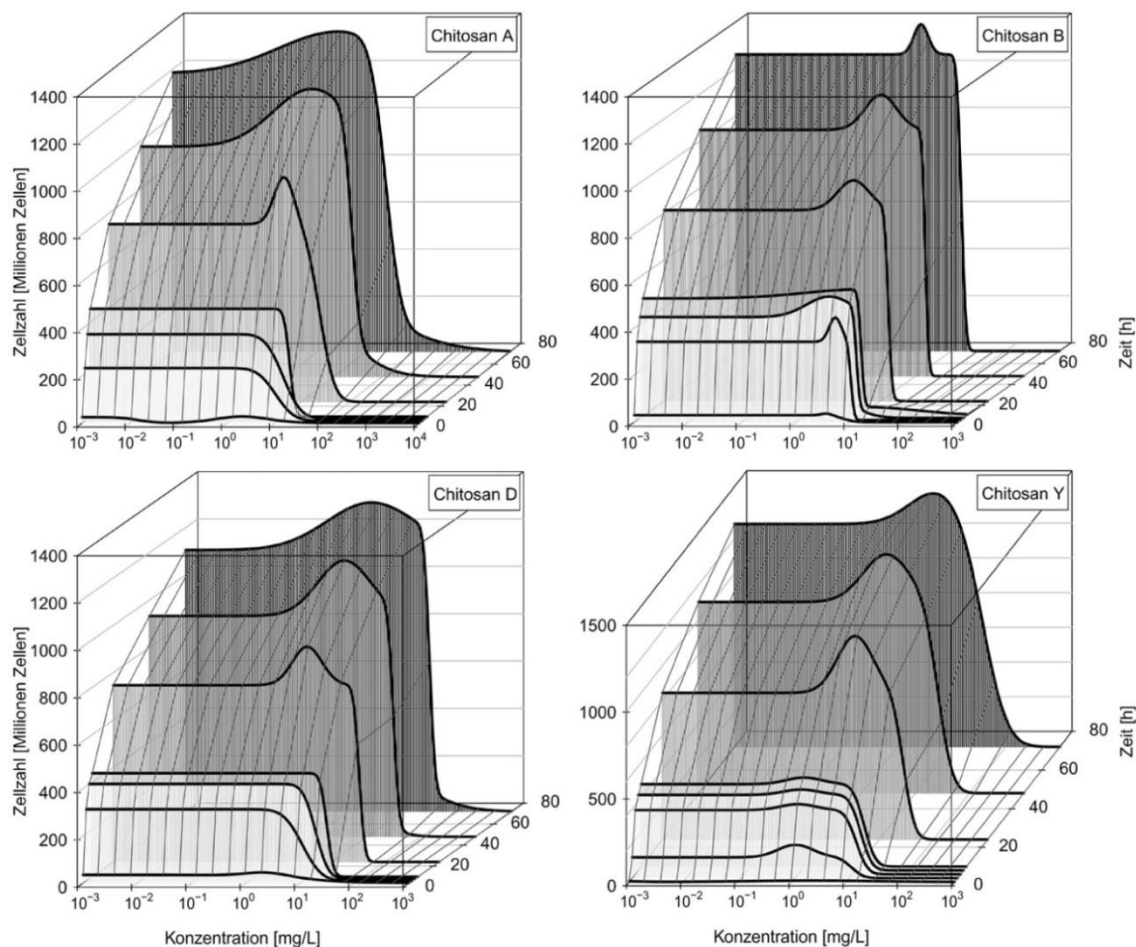


Abb. 14: Proliferationsverlauf über 72 Stunden unter Einfluss von Chitosanen

Für jedes Zeitintervall, das eine Schätzung erlaubte, ist die Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Zellzahl in Abhängigkeit zur Konzentration [mg/L]) separat geschätzt und abgebildet worden (hellgrau bis dunkelgrau). Chitosan Y [0.10] erreichte eine höhere Zellzahl, was eine Anpassung des Achsenintervalls nötig machte. Unter Einfluss von Chitosan X [0.44] war keine Beeinträchtigung des Wachstums erkennbar. Auf eine Abbildung wurde daher verzichtet.

Zusammenfassend wurden in Abb. 14 und Abb. 15 die geschätzten Konzentrations-Wirkungskurven aller untersuchten Substanzen über die Zeit in 3D-Graphiken dargestellt. Der Einfluss der Hormese im Kurvenverlauf bei Chitosan A [0.08], Chitosan Y [0.10] und Glucosamin war deutlich zu erkennen. Bei den übrigen Substanzen wurden die Steilheit der Kurve und damit die Lage der EC-Werte weniger durch die Hormese beeinträchtigt. Mit Ausnahme von Chitosan X [0.44] ließ sich bei allen Substanzen ein deutlicher Zusammenhang zwischen Konzentration und Wirkung erkennen. Innerhalb der ersten 10 Stunden kam es in den hohen Konzentrationen von Chitosan X [0.44] zu einer Hemmung des Wachstums, doch anschließend setzte das Wachstum der Bakterien wieder ein, so dass keine Konzentrations-Wirkungskurven über den gesamten Versuchsverlauf abzuleiten waren (siehe Anhang 04_01).

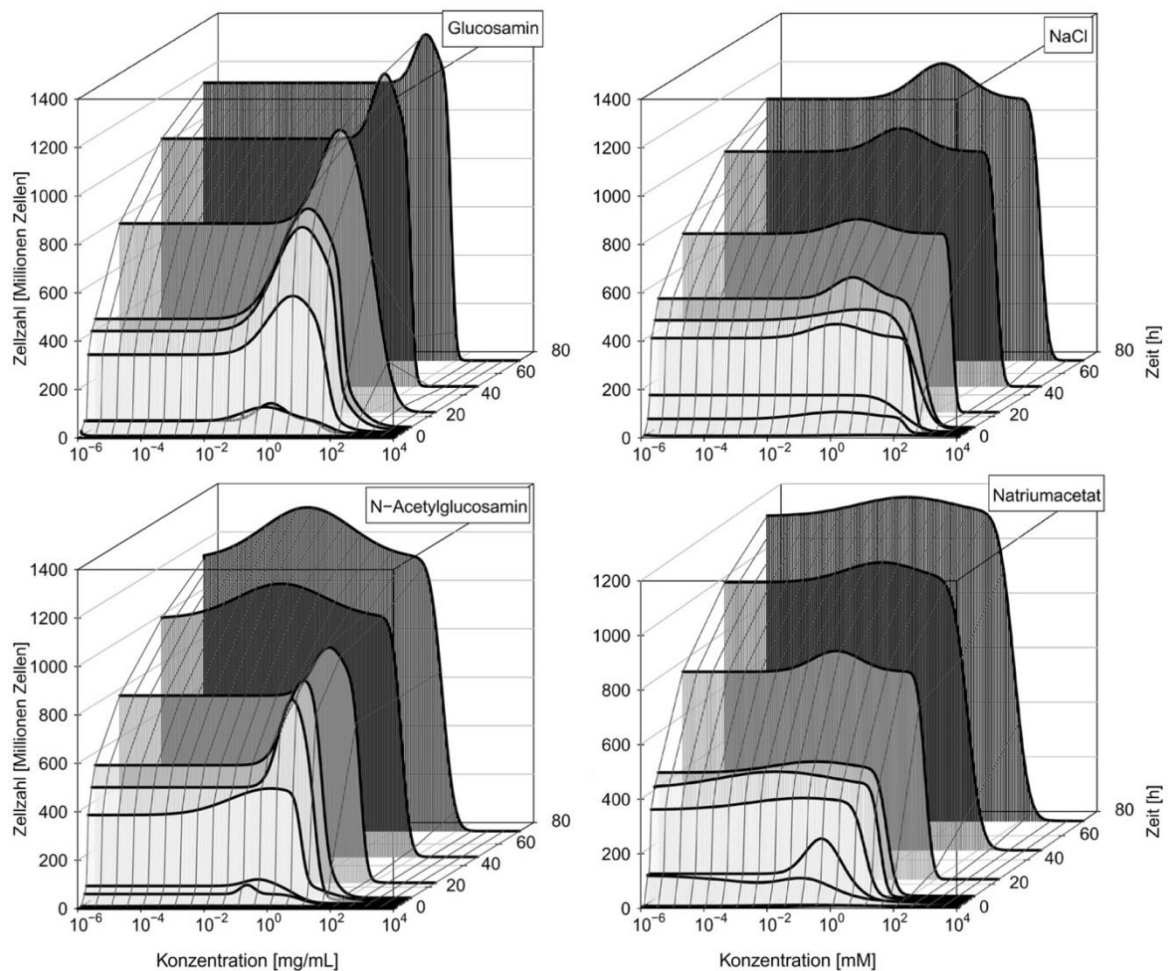


Abb. 15: Proliferationsverlauf über 72 Stunden bei Monomeren und Substanzkontrollen

Für jedes Zeitintervall, das eine Schätzung erlaubte, wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Zellzahl in Abhängigkeit zur Konzentration) separat geschätzt und abgebildet (hellgrau bis dunkelgrau). Die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin wurden in mg/mL und die Substanzkontrollen Natriumchlorid (NaCl) und Natriumacetat in mM angegeben. Unter dem Einfluss von Natriumacetat erreichte das Wachstum eine geringere Zellzahl, worauf das Achsenintervall angepasst wurde.

Der Einfluss der Hormese wirkte sich auch zeitlich verschieden bei den Chitosanen, Monomeren und Substanzkontrollen aus. Bei Chitosan A [0.08] nahm mit der Zeit die Ausprägung der Hormese zu. Der Abfall der Kurven von Chitosan B [0.02] hingegen war steiler, wobei die Hormese mit zunehmender Inkubationszeit weniger ausgeprägt war. Chitosan D [0.13] zeigte über die Zeit eine mit Chitosan A [0.08] vergleichbare Zunahme der Ausprägung der Hormese. Ebenso verhielt es sich bei Chitosan Y [0.10]. Der Kurvenverlauf von Chitosan Y [0.10] war jedoch deutlich flacher als bei den anderen Substanzen. Bei den Substanzkontrollen war eine flächigere Ausprägung der Hormese bei N-Acetylglucosamin zu verzeichnen, die durch ihre Lage jedoch auf den weiteren Kurvenverlauf und die Ableitung der EC-Werte kaum Einfluss nahm. Glucosamin hingegen zeigte im Bereich des weiteren Kurvenabfalls eine deutliche Abhängigkeit zur Hormese, was zu einem steilen Kurvenverlauf und eng beieinander liegenden EC-Werten führte. Bei den Substanzkontrollen hatte die Hormese keinen Einfluss auf den weiteren Kurvenverlauf.

In den meisten Fällen war nach 24 Stunden die stationäre Phase der Bakterien eingetreten, so dass die Testansätze nicht weiter fortgesetzt und beobachtet wurden. In dem vorliegenden Test kam es vor, dass Wells, in denen nach beispielsweise 24 Stunden keine messbare Trübung vorhanden war, nach 72 Stunden eine deutliche Trübung sichtbar war. So wurde deutlich, dass das Bakterienwachstum auch nach 24 Stunden weiter voranschritt und durch die Hemmwirkung der jeweiligen Substanz beeinflusst wurde, bzw. die Hemmwirkung mit der Zeit nachließ. Innerhalb der Zeitspanne 24-72 Stunden zeigte sich der Beginn der stationären Phase und die Wachstumszunahme von 48 zu 72 Stunden fiel deutlich geringer aus. Die Form der Überdauerung (z.B. in Form von Aggregaten) wurde hierbei nicht näher untersucht. Nach 72 Stunden war der Testdurchlauf beendet.

Diese Beobachtung spiegelte sich weniger in der Entwicklung der EC-Werte wider (Abb. 16). Auf der logarithmischen Skala der Konzentration gab es nur geringfügige Veränderungen der EC_{10} , EC_{50} und EC_{90} -Werte nach 24 Stunden bei den Chitosanen A [0.08], B [0.02] und D [0.13], sowie beim Monomer N-Acetylglucosamin. Bei Chitosan X [0.44] konnten nur in den ersten Stunden eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung berechnet werden, aus denen sich EC-Werte ableiten ließen. Nach 10 Stunden waren keine Unterschiede in den Konzentrationen oder zur Kontrolle feststellbar (siehe Anhang 04_01). Chitosan X [0.44] gehörte mit Chitosan Y [0.10] zu den kurzkettigeren der untersuchten Chitosane. Chitosan Y [0.10] wurde in denselben Konzentrationen den Bakterien zugegeben, wie Chitosan X [0.44], zeigte jedoch einen mit den übrigen Chitosanen vergleichbaren Effekt mit einem leichten Anstieg der EC-Werte nach 72 Stunden. Beim Monomer Glucosamin stiegen

die EC-Werte bis zur Messung bei 24 Stunden deutlich an. Anschließend fielen die EC-Werte deutlich. Bei den Substanzkontrollen Natriumchlorid und Natriumacetat stiegen die EC-Werte auch nach 24 Stunden noch deutlich an.

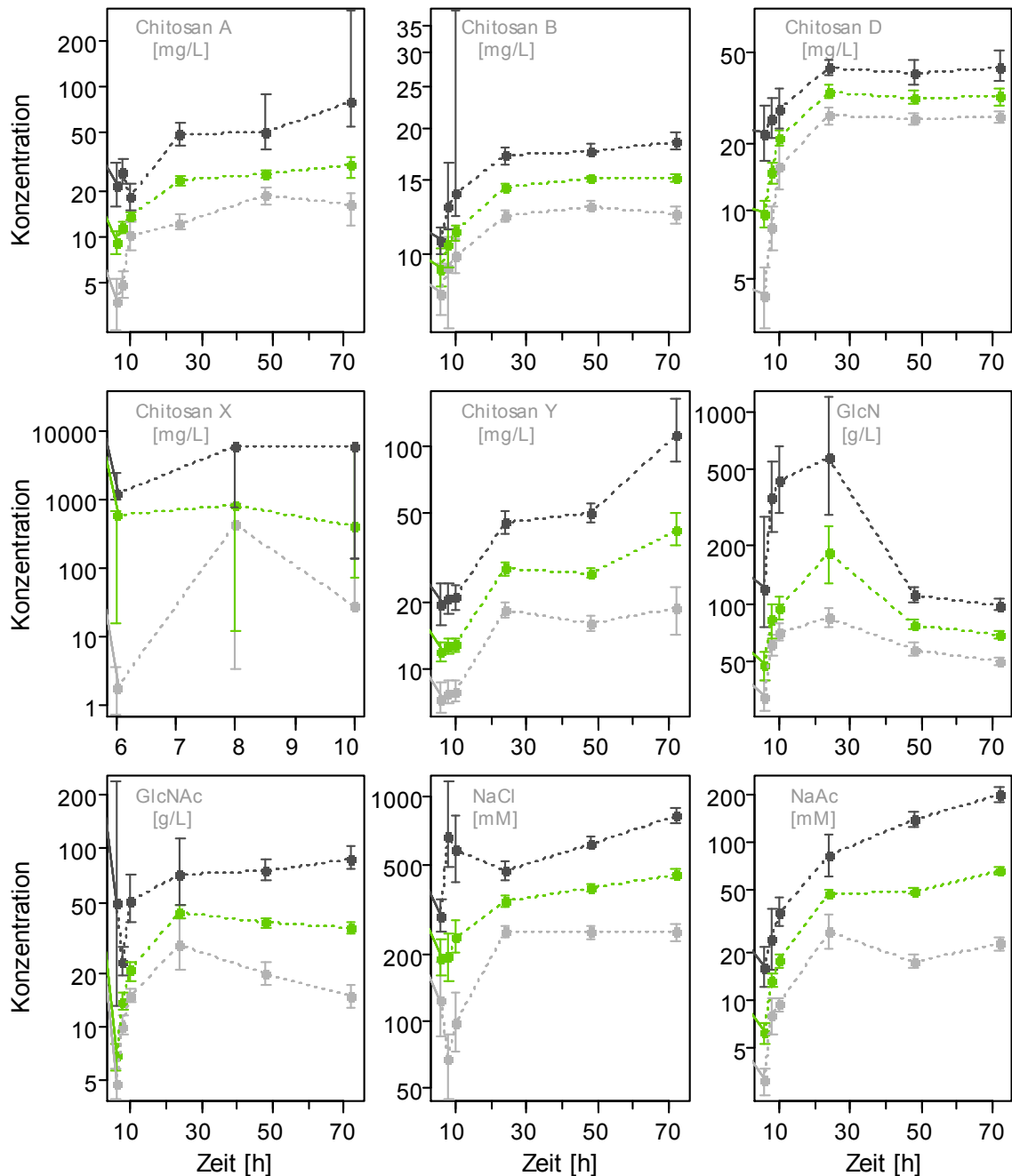


Abb. 16: Verlauf der EC-Werte im Proliferationsassay

Abgebildet wurden die EC₁₀- (dunkelgrau), EC₅₀- (grün) und EC₉₀-Werte (hellgrau) in dem Zeitraum von 6-72 Stunden. Für Chitosan X [0.44] konnte nur eine Abschätzung innerhalb der ersten zehn Stunden vorgenommen werden (Abszisse entsprechend angepasst). Die Konzentrationen wurden separat für die Vergleichbarkeit innerhalb einer Substanz für jede Graphik individuell angegeben (abweichende Ordinaten). Für alle Chitosane wurden die Konzentrationen in mg/L, für die Monomere in g/L und für die Substanzkontrollen in M angegeben. GlcN – Glucosamin, GlcNAc – N-Acetylglucosamin, NaCl – Natriumchlorid, NaAc – Natriumacetat.

Die genauere Betrachtung der EC-Werte zum Zeitpunkt der 48 Stunden-Messung konnte daher als repräsentativ angesehen werden (Abb. 17 - Detailansicht für die Chitosane).

Die bedeutendsten Hemmungen des Wachstums fanden bei den Chitosanen, mit Ausnahme von Chitosan X [0.44], nach 48 Stunden in einem Konzentrationsbereich von 10-100 mg/L unter Berücksichtigung der Konfidenzintervalle statt.

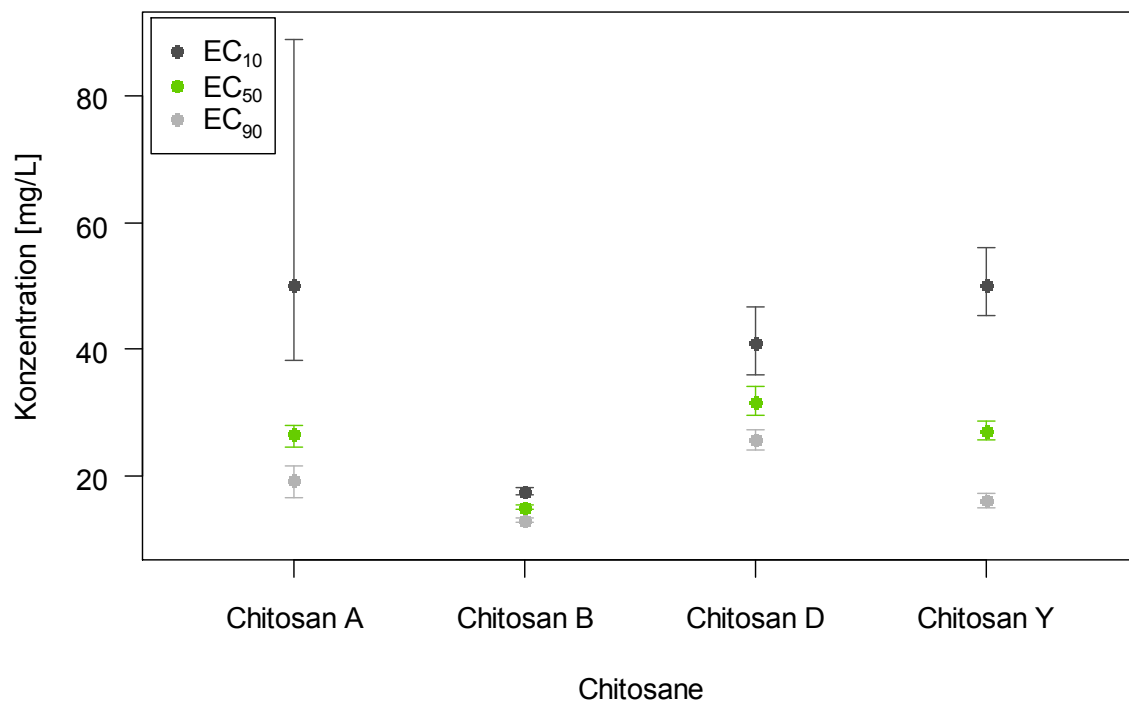


Abb. 17: EC-Werte der Chitosane im Proliferationsassay nach 48 h

Zum Vergleich der jeweiligen EC-Werte der Chitosane untereinander wurden die EC-Werte in dunkelgrau: EC₁₀, grün: EC₅₀ und in hellgrau: EC₉₀ mit den entsprechenden Konfidenzintervallen für die untersuchten Chitosane A [0.08], B [0.02], D [0.13] und Y [0.10] in mg/L angegeben. Sie wurden berechnet aus der Konzentrations-Wirkungsbeziehung nach 48 Stunden.

Bei Chitosan A [0.08] und Chitosan Y [0.10] nahm die Wirkung mit steigender Konzentration deutlich langsamer zu. Die EC-Werte lagen daher weit auseinander. 19.29 mg/L Chitosan A [0.08], bzw. 16.10 mg/L Chitosan Y [0.10], bewirkten eine 10 %ige Hemmung, wobei erst 50.15 mg/L Chitosan A [0.08], bzw. 50.06 mg/L Chitosan Y [0.10], eine 90 %ige Hemmung hervorriefen. Der EC₅₀-Wert lag bei Chitosan A [0.08] bei 26.62 mg/L und bei Chitosan Y [0.10] bei 27.6 mg/L. Die Konfidenzintervalle der EC-Werte von Chitosan A [0.08] waren deutlich breiter als bei Chitosan Y [0.10]. Chitosan B [0.02] entfaltete hingegen sehr schnell seine Wirksamkeit bei steigender Konzentration. Eine 10 %ige Wirkung wurde bereits bei einer niedrigen Konzentration von 13 mg/L erreicht. Der EC₅₀-Wert betrug 15.13 g/L und bei 17.61 g/L war bereits eine 90 %ige Hemmwirkung zu verzeichnen. Chitosan B [0.02] zeigte somit die stärkste und schnellste Wirkung bei der

geringsten Chitosan Konzentration. Chitosan D [0.13] begann erst bei höheren Konzentrationen zu wirken, was sich in einem EC₁₀-Wert von 25.7 mg/L widerspiegelte. Der EC₅₀-Wert lag ebenfalls über allen anderen getesteten Chitosanen. Allerdings wirkte Chitosan D [0.13] stärker als Chitosan A [0.08] und Chitosan Y [0.10], da der EC₉₀-Wert bereits bei einer Konzentration von 40.96 mg/L erreicht wurde (Tab. 10).

Tab. 10: EC-Werte der Chitosane nach 48 Stunden im Proliferationsassay

Angegeben wurden die EC-Werte der Kurve mit dem jeweiligen Konfidenzintervall. Die EC-Werte beziehen sich auf das Wachstum, so dass beispielsweise der EC₉₀-Wert 90 % Wachstum und damit einer 10 % Hemmung entspricht.

| | EC ₉₀ [mg/L] | EC ₅₀ [mg/L] | EC ₁₀ [mg/L] |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Chitosan A | 19.29 (16.55 - 21.56) | 26.62 (24.51 - 28.10) | 50.15 (38.37 - 88.91) |
| Chitosan B | 13.00 (12.73 - 13.36) | 15.13 (14.86 - 15.38) | 17.61 (17.13 - 18.23) |
| Chitosan D | 25.70 (24.21 - 27.25) | 31.74 (29.53 - 34.08) | 40.96 (36.07 - 46.78) |
| Chitosan Y | 16.10 (14.99 - 17.34) | 27.06 (25.80 - 28.65) | 50.06 (45.26 - 55.97) |

Bei den Monomeren trat eine Wirkung in dem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 100 g/L auf. Natriumchlorid zeigte ab einer Konzentration von 100 mM und Natriumacetat ab einer Konzentration von 10 mM erste negative Auswirkungen auf das Wachstum. Detaillierter ließ sich das anhand der EC-Werte darstellen (Abb. 18). Die EC-Werte nach 48 Stunden lagen bei Glucosamin deutlich höher als bei N-Acetylglucosamin. Gleiches galt für die Substanzkontrollen. NaCl wies gegenüber Natriumacetat deutlich höhere EC-Werte auf.

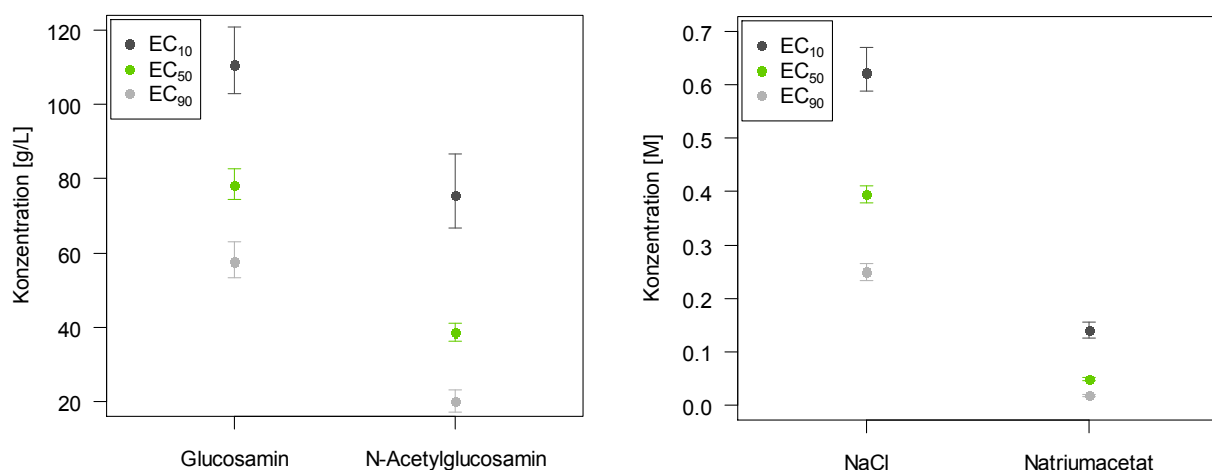


Abb. 18: EC-Werte der Monomere und Substanzkontrollen

EC-Werte aus dem Proliferationsassay mit *E. coli* nach 48 Stunden. Angegeben wurden die EC-Werte in dunkelgrau: EC₁₀-, grün: EC₅₀- und in hellgrau: EC₉₀-Werte mit den entsprechenden Konfidenzintervallen für die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin (links) in g/L und für die Substanzkontrollen Natriumchlorid (NaCl) und Natriumacetat (rechts) in M. Sie wurden berechnet aus der Konzentrations-Wirkungsbeziehung nach 48 Stunden.

Die Korrelationsstudien ergaben eine Korrelation nach Pearson von dem EC_{50} -Wert mit dem F_A ($r = 0.984$, $p = 0.016$) und dem P_A ($r = 0.957$, $p = 0.043$). Die übrigen Studien über eine PCA oder nach Spearman erbrachten keine signifikanten Korrelationen des EC_{50} -Wertes zum F_A oder P_A bezogen auf das Niveau $\alpha = 5\%$, jedoch zum Niveau $\alpha = 10\%$.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses auf die Proliferation von *E. coli*

Geringe Chitosankonzentrationen rufen deutlich hormetische Effekte hervor. Die Wirkung der Chitosane ist darüber hinaus zeitlich abhängig. Chitosankonzentrationen verlieren mit der Zeit ihre hemmende Wirkung, so dass ein Wachstum auch bei einer vermeintlich 100 % hemmenden Konzentration stattfinden kann, wenn die Beobachtung über 24 Stunden hinaus fortgesetzt wird. Die Form der Überdauerung wurde in diesem Test dabei nicht näher untersucht. Die stärkste Wirkung zeigte sich bei Chitosan B [0.02].

3.3.2 TEM Aufnahmen chitosanbehandelter *Escherichia coli* Bakterien

Unter dem Transmissionselektronenmikroskop (Abb. 19) war zu erkennen, dass in den ersten Untersuchungen der Kontrolle (Abb. 19 A) die *E. coli* Bakterien eine normale Stäbchenform aufwiesen (Abb. 19 A-I und A-II). Es war eine hohe Zelldichte vorhanden und in der Vergrößerung waren ausschließlich leichte Ablösungen bzw. eine „Verdickung“ der Zellwand zu erkennen (Abb. 19 A-III und IV). Die äußere Membran war darüber hinaus intakt und wies keine vesikulären Strukturen auf. Ebenso lag das Zytoplasma gleichmäßig verteilt innerhalb der Zelle vor und zeigte keine degenerativen Veränderungen (Abb. 19 A-V). 30 Minuten nach Zugabe des Chitosans D [0.13] (Abb. 19 B) waren erste Verformungen der gesamten Zellen zu erkennen (Abb. 19 B-I). Die äußere Membran bildete kleine „Vesikel“ aus (auch als *blebs* oder *blebbing* bezeichnet), die sich deutlich von der Zytoplasmamembran abhoben (Abb. 19 B-II und B-III). Die Zerstörung der Zellen war teilweise bereits fortgeschritten. Es war weniger Zellinhalt zu erkennen und die Zellwand bestand nahezu ausschließlich aus *blebs* (Abb. 19 B-IV und B-V). Dieser Prozess setzte sich mit zunehmender Inkubationszeit fort. Nach 3 Stunden war die überwiegende Anzahl der Zellen deformiert und begannen sich aufzulösen (Abb. 19 C). Die Zellwände wiesen mittlerweile große *blebs* auf, die über die gesamte Oberfläche verteilt vorkamen (Abb. 19 C-III und C-IV). Teilweise waren sowohl die Zellwand als auch die Zytoplasmamembran degeneriert. Die Zellinhalte waren nur noch an den Rändern innerhalb der Zellen auszumachen (Abb. 19 C-I bis C-V). Nach Ablauf von 21 Stunden unterlagen ausnahmslos alle Zellen einer starken Deformation (Abb. 19 D-I und D-II), die sich nur geringfügig von der nach 3 Stunden unterschied (Abb. 19 D-III bis D-V).

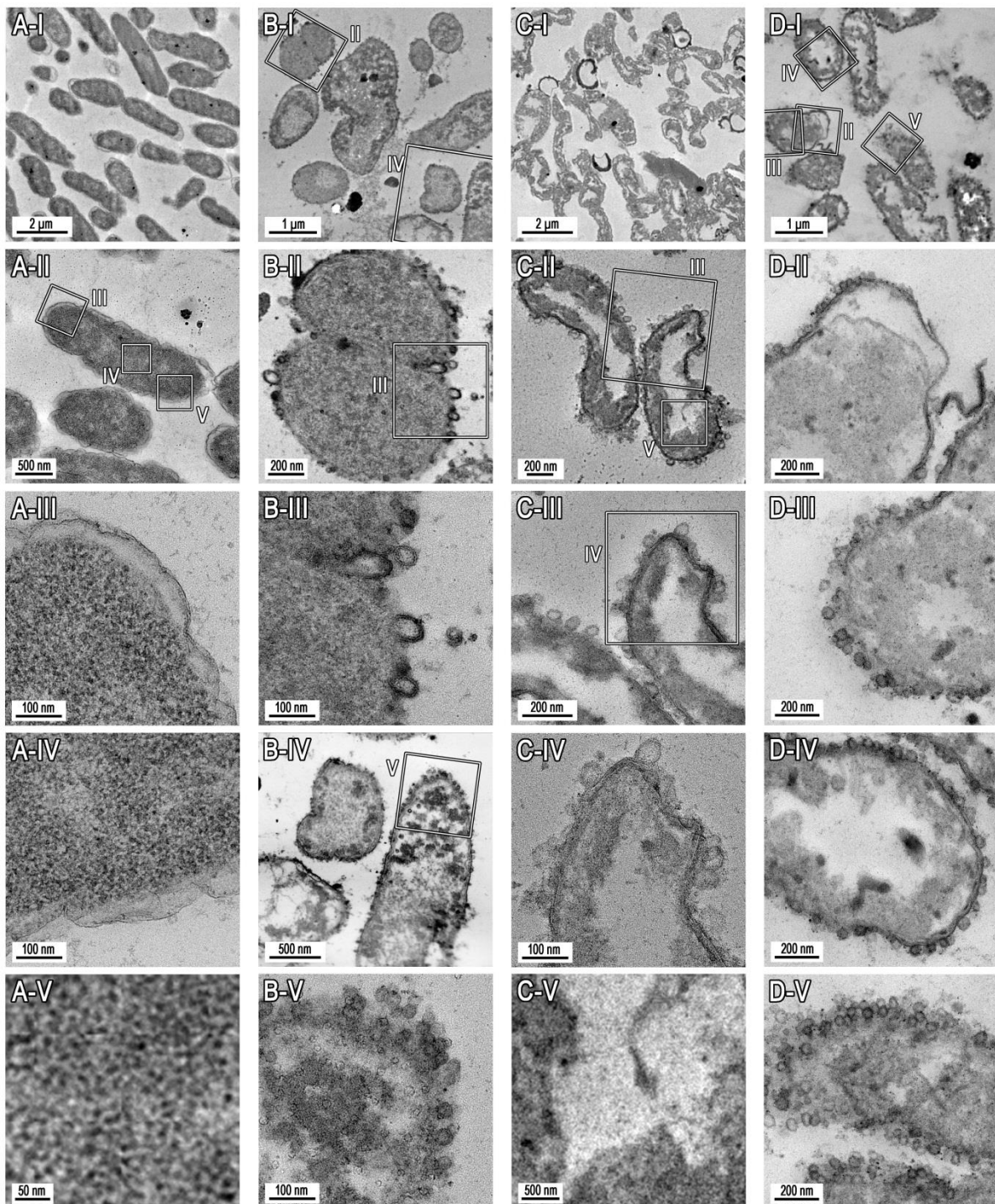


Abb. 19: Zeitabhängige Deformation chitosanbehandelter *E. coli* Bakterien

Im Anschluss an eine Exposition mit Chitosan D [0.13] bei einem pH-Wert von 5.5 erfolgten die Einbettung in Epoxidharz und die Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die Aufnahme erfolgte am *FEI Tecnai F20 STwin* Transmissionselektronenmikroskop (TEM) mit einer Punktauflösung von 0.24 nm mit 200 kV im BF-TEM Modus. Aufnahme der unterschiedlichen Inkubationszeiten (spaltenweise) A: Kontrolle, B: nach 30-minütiger Inkubation; C: nach 3-stündiger Inkubation; D: nach 21-stündiger Inkubation. Vergrößerung (zeilenweise) I: Übersicht; II-V: Detailaufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen. Der Ausschnitt einer Vergrößerung wurde dabei immer als Quadrat in den vorangegangenen Bildern angegeben. Teilweise wurden unterschiedliche Ausschnitte aus einer Abbildung vergrößert.

Teile der äußeren Membran waren vollständig von der inneren Membran gelöst, die sich wiederum deutlich von der Zytoplasmamembran abhob (Abb. 19 D-II). Im Unterschied zu den übrigen Inkubationszeiten waren nach 21 Stunden nur noch vereinzelt Zellen innerhalb einer Probe auszumachen. Der übrige Probenanteil bestand aus plasmaähnlichen Bestandteilen und Zellfragmenten.

Bei den seriellen Aufnahmen bei einem pH-Wert von 6.0 (Abschnitt 2.5.4.2) waren neben den Bakterien insbesondere Strukturen außerhalb der Zellen zu erkennen, die mit steigender Konzentration vermehrt auftraten (Abb. 20 und Abb. 21 C-I unten links).

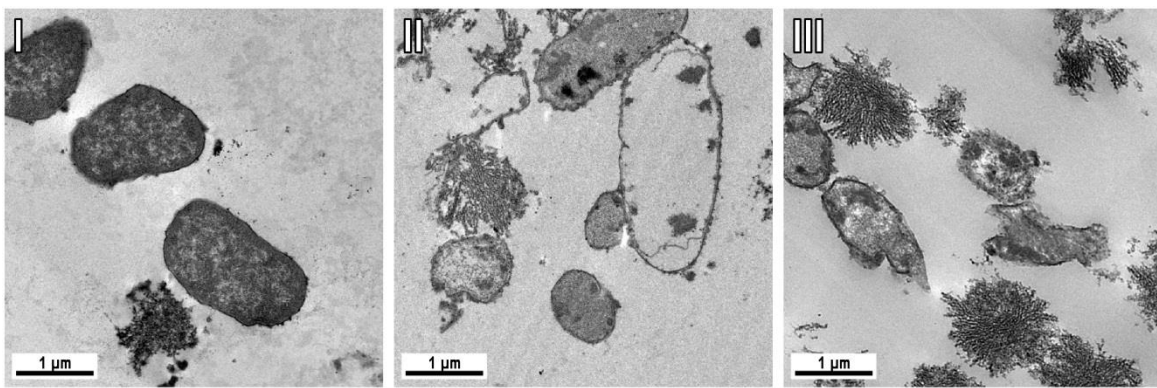


Abb. 20: Aggregatbildung mit steigender Chitosankonzentration

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Bakterien und Chitosanaggregaten nach 3 Stunden Inkubation. Die Inkubation erfolgte mit verschiedenen Chitosankonzentrationen bei einem pH-Wert von 6.0 gefolgt von der Einbettung in Epoxidharz und einer Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die Aufnahme wurden am *FEI Tecnai F20 STwin* Transmissionselektronmikroskop mit einer Punktauflösung von 0.24 nm mit 200 kV im BF-TEM Modus vorgenommen. I: 0.1 g/L Chitosan D [0.13], II: 1 g/L Chitosan D [0.13], III: 10 g/L Chitosan D [0.13].

Die Zellen in den Kontrollen zeigten über den gesamten Versuchsverlauf eine intakte Zellwand und normale Stäbchenform (Abb. 21 A-I bis A-III). Das Zytoplasma wies leichte Unregelmäßigkeiten auf, zeigte aber keine Degeneration. Die chitosanbehandelten Zellen waren in ihrer Gesamtheit ähnlich deformiert, wie die Zellen der vorangegangenen Untersuchung. Bei der Konzentration von 0.1 g/L Chitosan (Abb. 21 B) waren nach 30 Minuten die Zellen noch intakt und vereinzelt Vesikel zu erkennen, deren Anzahl über die Zeit zunahm (Abb. 21 B-I bis B-III). Bei einer Konzentration von 1 g/L Chitosan (Abb. 21 C) trat nach 30 Minuten eine leichte Deformation der Zellen ein und Formationen aus Zellfragmenten traten in weiten Bereichen auf (Abb. 21 C-I unten rechts). Ebenso waren Aggregate von Chitosan zu erkennen (Abb. 21 C-I unten links).

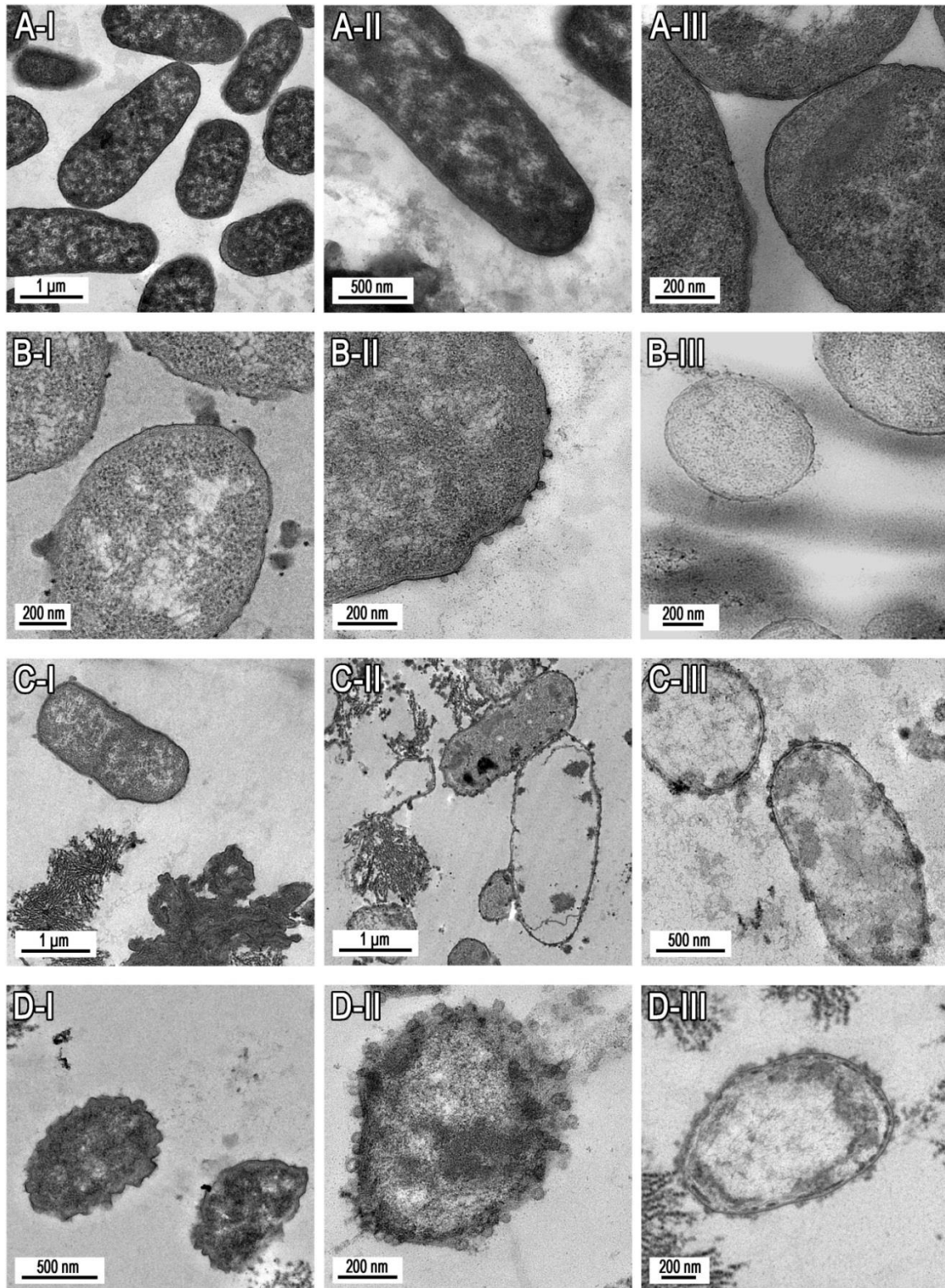


Abb. 21: Konzentrations- und zeitabhängige Deformation von *E. coli* Bakterien

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen erfolgten im Anschluss an eine Exposition mit Chitosan D [0.13] bei einem pH-Wert von 6.0, gefolgt von der Einbettung in Epoxidharz und einer Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die Aufnahmen wurden am *FEI Tecnai F20 STwin* Transmissionselektronenmikroskop mit einer Punktauflösung von 0.24 nm mit 200 kV im BF-TEM Modus vorgenommen. Die Konzentrationen wurden zeilenweise dargestellt - A: Kontrolle, B: 0.1 g/L Chitosan D [0.13], C: 1 g/L Chitosan D [0.13], D: 10 g/L Chitosan D [0.13]. Die Inkubationszeiten wurden spaltenweise dargestellt - I: nach 30-minütiger Inkubation, II: nach 3-stündiger Inkubation, III: nach 24-stündiger Inkubation

Nach 3 Stunden hatten sich an den Membranen zahlreiche Vesikel ausgebildet. Teile der Zellwand haben sich ganz von den Zellen gelöst, bzw. es waren häufiger Zellen auszumachen, von denen lediglich die Zellwand übrig geblieben war und die inhaltslos erschienen (Abb. 21 C-II). Nach 24 Stunden waren kaum noch intakte Zellen vorhanden und von diesen wiesen die meisten kaum noch Zellinhalte auf (Abb. 21 C-III). Bei einer Konzentration von 10 g/L Chitosan (Abb. 21 D) konnten ähnliche Deformationen festgestellt werden wie bei der Durchführung des Versuchs mit einem pH-Wert von 5.5 (Abb. 19). Nach 30 Minuten waren die Zellen bereits im Auflösen begriffen und die Zellwand verlor ihre Stabilität und Form (Abb. 21 D-I), was auch nach 3 Stunden durch ein vollständiges *blebbing* der Membranen gekennzeichnet wurde (Abb. 21 D-II). An diesem Punkt schien auch die Zytoplasmamembran mit betroffen zu sein. 24 Stunden nach Beginn der Inkubation waren nur noch wenige Zellen vorhanden. Diese besaßen darüber hinaus nur einen geringen oder keinen Zellinhalt (Abb. 21 D-III). Die Untersuchungen beschränkten sich dabei auf die Bakteriensuspension. Mögliche Bodensatz -Aggregate wurden nicht in die Untersuchung einbezogen.

Zusammenfassung der Untersuchung chitosaninduzierter Effekte mittels TEM

Mit steigender Inkubationszeit kam es sowohl bei pH 5.5 als auch bei pH 6.0 zu ansteigender Deformation der Bakterienzellen, vornehmlich bildeten sich vermehrt vesikuläre Strukturen. Besonders betroffen waren die äußeren Membranen. In den Konzentrationsreihen fiel auf, dass die Deformationen mehr zeit- als konzentrationsabhängig auftraten. Gleichzeitig waren bei einem pH-Wert von 6.0 in Abhängigkeit zur Konzentration zusätzliche Strukturen unabhängig von den Bakterienzellen zu erkennen, bei denen es sich vermutlich um Chitosanaggregate handelte. Mögliche Bodensatz-Aggregate aus bakteriellen Zellverbänden wurden nicht in die Untersuchung einbezogen. Die Existenz intakte Zellen kann daher nicht ausgeschlossen werden.

3.3.3 Effekt auf die Dehydrogenaseaktivität von *Escherichia coli*

Die Dehydrogenaseaktivität wurde in einem Konzentrationsbereich von ca. 7 mg/L bis 80 mg/L durch Chitosane beeinträchtigt. Dabei traten nur geringfügige Abweichungen der Wirkungsintensitäten auf (Abb. 22 und Abb. 23). Chitosan A [0.08] zeigte im Chitosan-Vergleich bei der geringsten Konzentration eine hemmende Wirkung. So erzeugten die Chitosane in der Reihenfolge A [0.08], D [0.13], B [0.02] und Y [0.10] mit ansteigender Konzentration eine 90 %ige Aktivität, was einer 10 %igen Hemmung entspricht. Chitosan A [0.08] verfügte von allen getesteten Chitosanen über das breiteste Wirkungsspektrum, wodurch die maximale Wirkung erst bei der vergleichsweise höchsten Chitosankonzentration eintrat.

Tab. 11: EC-Werte der Chitosane im Dehydrogenase Assay mit *E. coli*
 EC-Werte der Kurve mit dem Konfidenzintervall in Klammern angegeben.

| | EC ₉₀ [mg/L] | EC ₅₀ [mg/L] | EC ₁₀ [mg/L] |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Chitosan A | 9.86 (7.25 - 13.42) | 20.01 (16.69 - 23.99) | 40.60 (24.19 - 68.17) |
| Chitosan B | 12.70 (8.84 - 18.25) | 22.14 (15.51 - 31.63) | 38.61 (25.49 - 58.49) |
| Chitosan D | 10.19 (7.48 - 13.88) | 18.47 (13.72 - 24.79) | 33.48 (15.06 - 74.52) |
| Chitosan Y | 16.97 (13.26 - 21.71) | 26.77 (20.41 - 35.12) | 42.23 (29.83 - 59.79) |

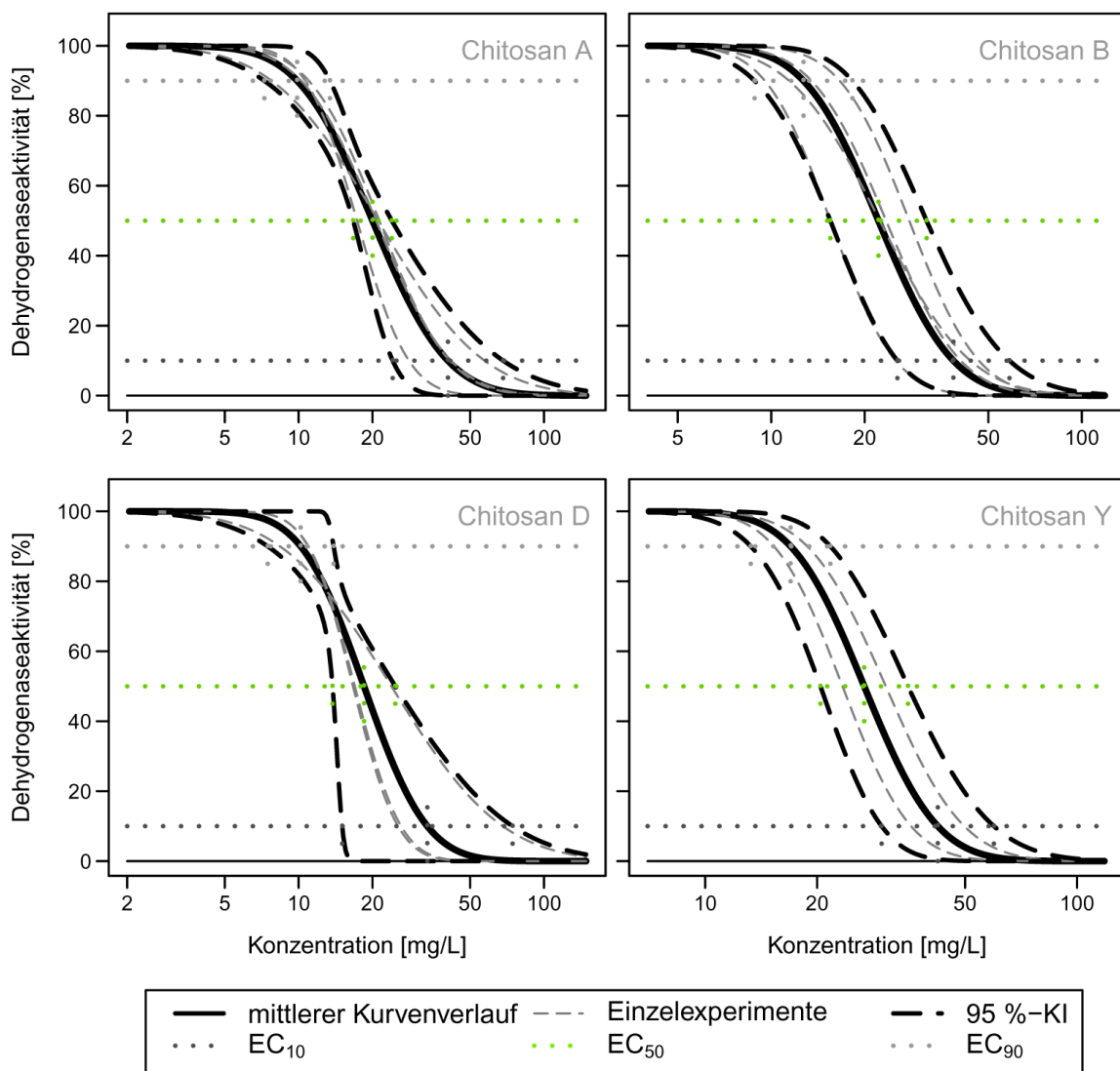


Abb. 22: Dehydrogenaseaktivität von *E. coli* unter Einfluss von Chitosan

Aus den Ergebnissen der Einzelerperimente (graue dünn gestrichelte Linie) ergab sich für jedes Chitosan der jeweilige Kurvenverlauf (schwarze dicke Linie) mit dem zugehörigen 95 %-Konfidenzintervall (KI: gestrichelte dicke schwarze Linie). Die EC₁₀-, EC₅₀- und EC₉₀-Werte wurden jeweils in dunkelgrau, grün bzw. hellgrau gekennzeichnet. Die Dehydrogenaseaktivität wurde auf der Ordinate für jedes Chitosan gleich dargestellt, die Abszisse wurde jedoch entsprechend dem Wirkungsintervall des jeweiligen Chitosans angepasst.

In der Reihenfolge Chitosan D [0.13], Chitosan B [0.02], Chitosan A [0.08] und Chitosan Y [0.10] bewirkten die Chitosane mit ansteigender Konzentration eine 10 %ige Aktivität bzw. eine 90 %ige Hemmung.

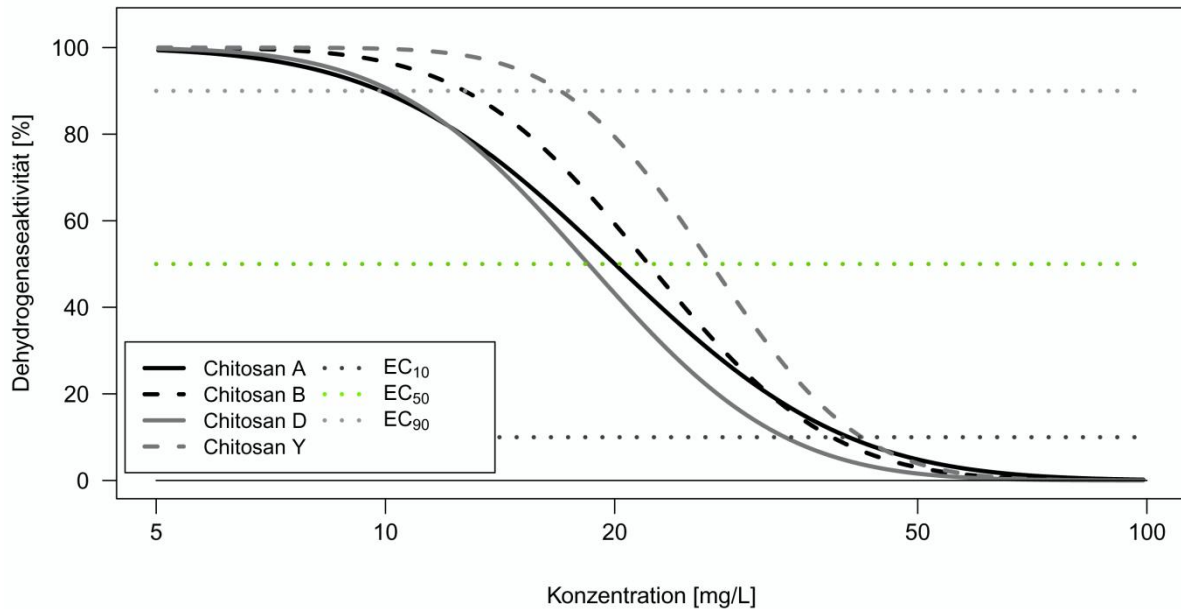


Abb. 23: Wirkung der Chitosane auf die Dehydrogenase von *E. coli*

Zum Vergleich der Wirkung der Chitosane wurde der mittlere Kurvenverlauf der Dehydrogenaseaktivität von *E. coli* nach Behandlung mit den Chitosanen A [0.08] (schwarze Linie), B [0.02] (schwarze gestrichelte Linie), D [0.13] (graue Linie) und Y [0.10] (graue gestrichelte Linie) angegeben. Die EC₁₀-, EC₅₀- und EC₉₀-Werte wurden jeweils durch eine dunkelgraue, grüne bzw. hellgraue gepunktete Linie gekennzeichnet.

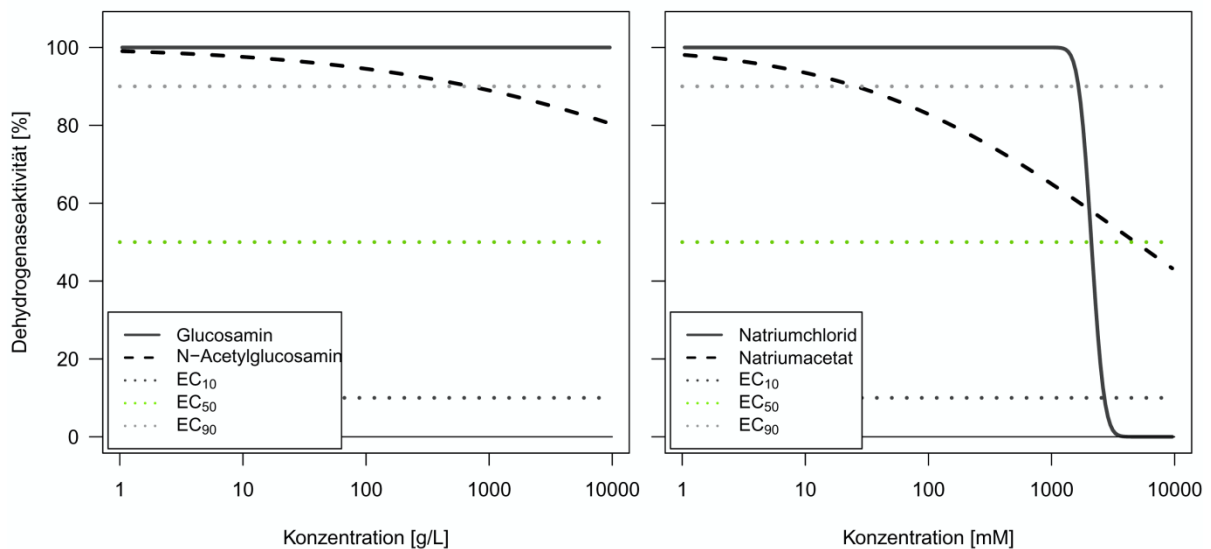


Abb. 24: Dehydrogenaseaktivität durch Substanzkontrollen oder Monomere bei *E. coli*.

Zum direkten Vergleich wurden die mittleren Kurvenverläufe der Dehydrogenaseaktivitäten von *E. coli* dargestellt. Angegeben wurden die EC-Werte durch dunkelgraue: EC₁₀-, grüne: EC₅₀- und hellgraue gestrichelte Linien: EC₉₀-Werte für die Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin wurden in g/L und für die Substanzkontrollen Natriumchlorid und Natriumacetat in mM aufgeführt.

Im Vergleich zu Chitosan A [0.08] zeigte Chitosan D [0.13] eine ähnliche Wirkung in den niedrigen Konzentrationen. Bei den effektiven Konzentrationen wurde allerdings die Dehydrogenaseaktivität unter Einfluss von Chitosan D [0.13] am stärksten gehemmt. Die Aktivität der Dehydrogenase ging durch Chitosan D [0.13] bereits bei 33.48 mg/L auf 10 % zurück (Tab. 11). Auch im Vergleich der EC_{50} -Werte wirkte Chitosan D [0.13] bei der geringsten Konzentration, gefolgt von Chitosan A [0.08] und Chitosan B [0.02]. Chitosan Y [0.10] benötigte mit 26.77 mg/L die deutlich höchsten Konzentrationen für eine 50 %ige Hemmung. Aus dem Kurvenverlauf war zu erkennen, dass bei einer Konzentration von näherungsweise 80 mg/L Chitosan die Dehydrogenaseaktivität eingestellt war (Abb. 23). Die Monomere (Abb. 24) blieben selbst in höheren Konzentrationen von 10 g/L (= 10000 mg/L) nahezu wirkungslos auf die Dehydrogenaseaktivität. Erst bei Konzentrationen von > 1000 g/L zeigte ausschließlich N-Acetylglucosamin eine hemmende Wirkung. Natriumchlorid beeinträchtigte das Testsystem ebenfalls erst in hohen Konzentrationen von > 1.5 mol/L. Bei Natriumacetat zeigte sich hingegen ein stetig steigender Effekt mit Zunahme der Konzentration (Abb. 24). Ein 50 %iger Effekt war jedoch auch erst bei einer Konzentration von > 4.5 mol/L zu erkennen.

Die PCA ergab eine Korrelation der Hauptkomponenten (gebildet aus den EC_{10} -, EC_{50} - und EC_{90} -Werten) mit dem Polymerisationsgrad ($r = 0.988$, $p = 0.012$) und dem Anteil an Aminogruppen bezogen auf den Polymerisationsgrad ($DPF = DP \cdot (1 - FA)$) ($r = 0.966$, $p = 0.034$). Dieses spiegelte sich auch in den Korrelationsstudien nach Pearson wider, wo der Polymerisationsgrad, ebenso wie der Anteil der Aminogruppen, mit dem EC_{50} -Wert ($r = -0.998$, $p = 0.002$ und $r = -0.986$, $p = 0.014$) und dem EC_{90} -Wert ($r = -0.969$, $p = 0.031$ und $r = -0.971$, $p = 0.029$) korrelierte. Andeutungsweise bestand auch eine Korrelation mit dem Proteingehalt und den EC-Werten, sofern das Niveau α auf 10 % angehoben wurde (PCA: $r = -0.903$, $p = 0.097$; Pearson: EC_{50} -Wert: $r = 0.943$, $p = 0.057$, EC_{90} -Wert: $r = 0.956$, $p = 0.044$; Spearman: EC_{50} -Wert: $r = 0.949$, $p = 0.051$, EC_{90} -Wert: $r = 0.949$, $p = 0.051$).

Zusammenfassung der Dehydrogenaseaktivität unter Einfluss von Chitosan von *E. coli*

Die Chitosane A [0.08] und D [0.13] zeigten einen ähnlichen Wirkungsverlauf. Die Chitosane B [0.02] und Y [0.10] waren erst in höheren Konzentrationen im Vergleich zu A [0.08] und D [0.13] wirksam. Der Wirkungsbereich zwischen dem EC_{90} -Wert und dem EC_{10} -Wert erstreckte sich dabei auf eine Konzentration von 10-43 mg/L. Das Monomer N-Acetylglucosamin und Glucosamin bewirkten in den untersuchten Konzentrationen nur geringe bis keine Effekte. Auch die Substanzkontrollen zeigten erst in hohen Konzentrationen von >1 mol/L einen Effekt.

3.3.4 Effekt auf die Dehydrogenaseaktivität von *Bacillus subtilis*

Entgegen der Ergebnisse der Dehydrogenaseaktivität bei *E. coli* zeigten sich bei den Untersuchungen mit *B. subtilis*, dass die einzelnen Ergebniskurven wesentlich stärker voneinander abwichen. Hierdurch entstanden breitere Konfidenzintervalle als bei *E. coli*. Ansonsten zeigten sich bei *B. subtilis* ähnliche Reaktion, wie bei *E. coli* (Abschnitt 3.3.3). Der mittlere Kurvenverlauf war nahezu identisch mit den Kurvenverläufen bei *E. coli*, mit einer Tendenz dahingehend, dass bereits geringere Chitosankonzentrationen bei *B. subtilis* eine zu *E. coli* vergleichbare Wirkung erzielten (Abb. 25 und Abb. 26).

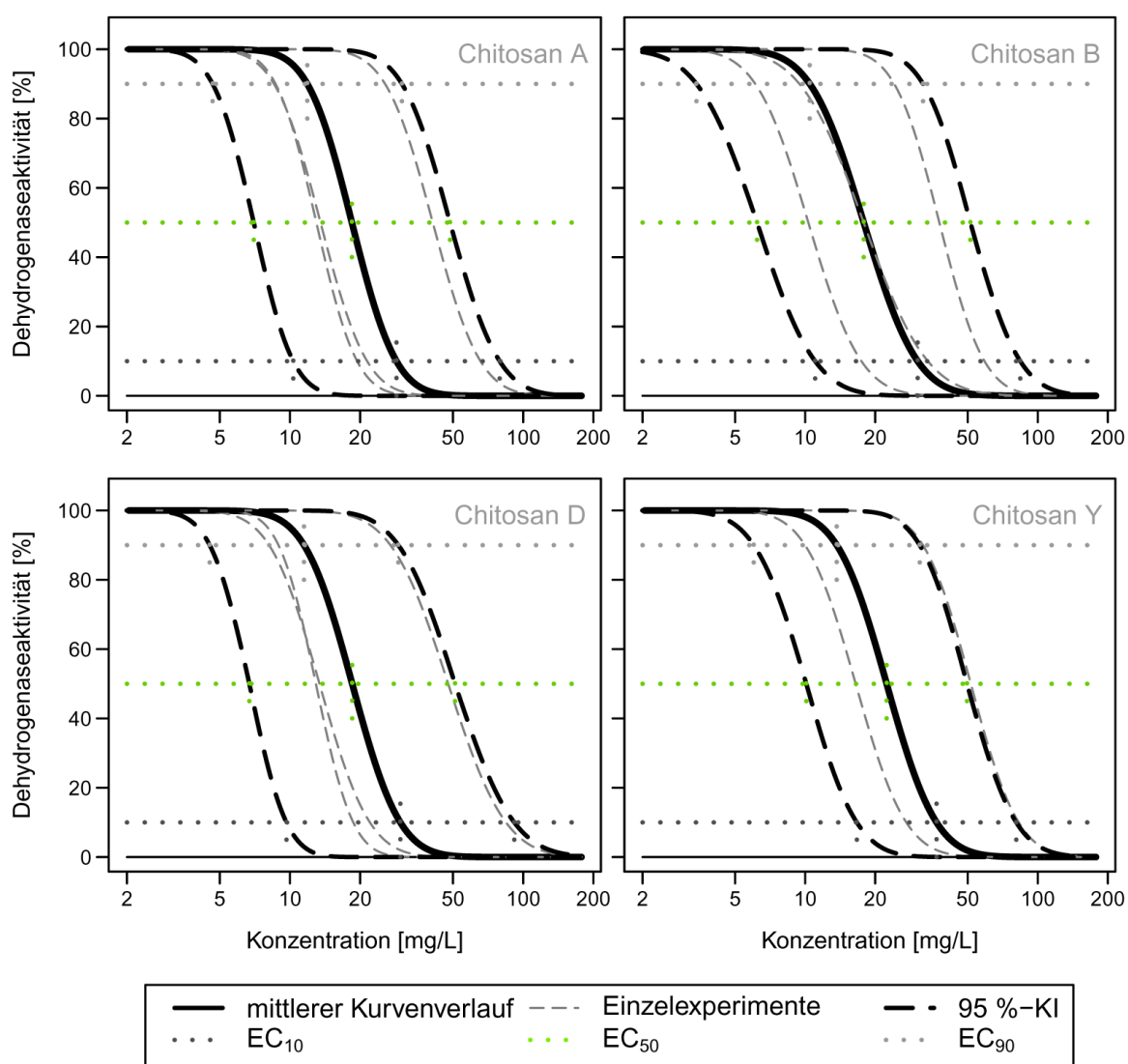


Abb. 25: Dehydrogenaseaktivität von *B. subtilis* unter Einfluss von Chitosan

Aus den Ergebnissen der Einzelexperimente (dunkelgraue dünn gestrichelte Linie) ergab sich für jedes Chitosan der jeweilige Kurvenverlauf (schwarze dicke Linie) mit dem zugehörigen Konfidenzintervall (gestrichelte dicke schwarze Linie). Die EC₁₀-, EC₅₀- und EC₉₀-Werte wurden jeweils durch eine dunkelgraue, grüne bzw. hellgraue gestrichelte Linie dargestellt.

Somit wirkten die Chitosane stärker hemmend auf *B. subtilis* als auf *E. coli*. Vom EC₉₀-Wert ausgehend erzielten die Chitosane in der Reihenfolge Chitosan B [0.02], Chitosan D [0.13], Chitosan A [0.08] und Chitosan Y [0.10] mit steigender Konzentration den EC₉₀-Wert (Tab. 12). Der Wirkungsbereich erstreckte sich dabei, bezogen auf den mittleren Kurvenverlauf, von 11-14 mg/L. Bei dem EC₁₀-Wert hingegen wich Chitosan Y [0.10] von den übrigen Chitosanen ab. Chitosan A [0.08], D [0.13] und B [0.02] erreichten in genannter Reihenfolge den EC₁₀-Wert mit Konzentrationen von 29-30 mg/L. Bei Chitosan Y [0.10] hingegen bedurfte es einer Konzentration von 37 mg/L, bis der EC₁₀ erreicht wurde (Tab. 12).

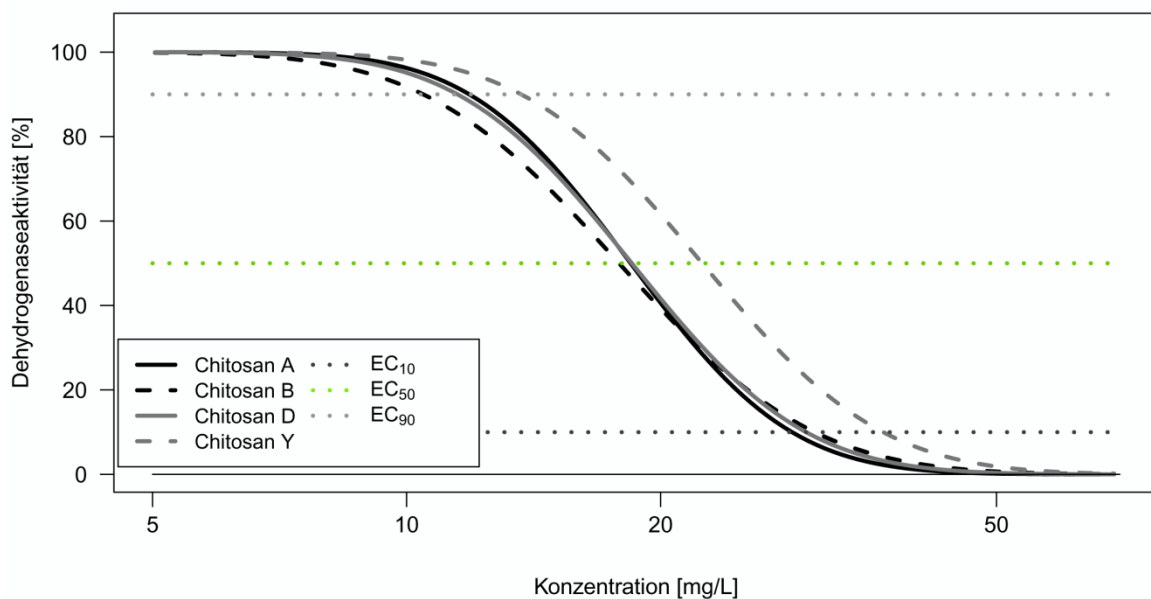


Abb. 26: Wirkung der Chitosane auf die Dehydrogenaseaktivität von *B. subtilis*

Mittlerer Kurvenverlauf der Dehydrogenaseaktivität von *B. subtilis* nach Behandlung mit den Chitosanen A [0.08] (schwarze Linie), B [0.02] (schwarze gestrichelte Linie), D [0.13] (graue Linie) und Y [0.10] (graue gestrichelte Linie). Die EC₁₀-, EC₅₀- und EC₉₀-Werte wurden jeweils durch eine dunkelgraue, grüne bzw. hellgraue gepunktete Linie gekennzeichnet.

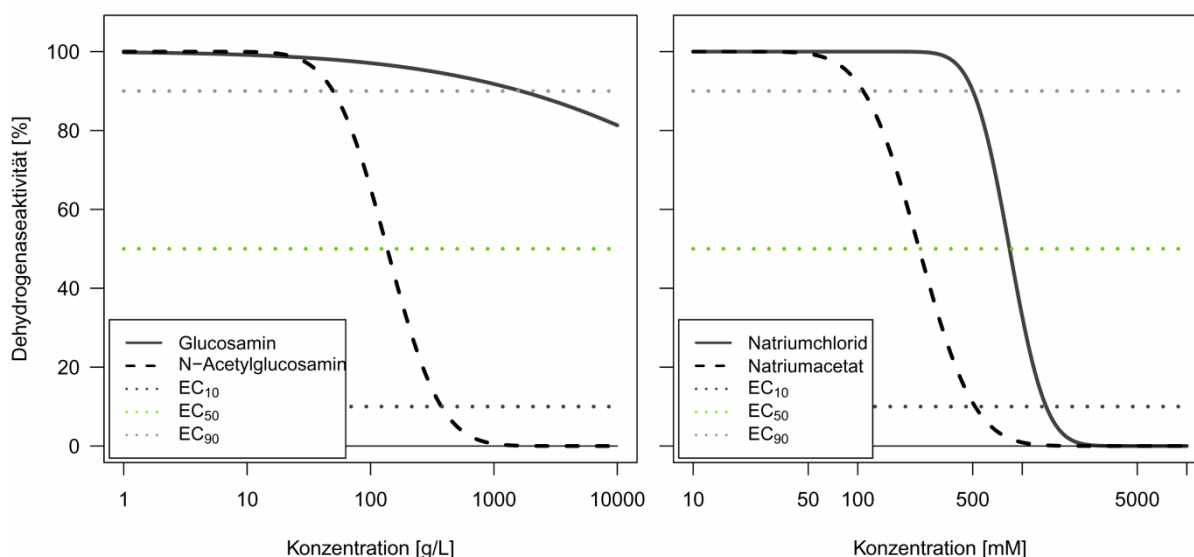
Eine deutliche Abweichung trat bei der Untersuchung der Monomere auf. Bei Glucosamin war ab einer Konzentration von >1000 g/L ein beginnender Effekt zu verzeichnen und N-Acetylglucosamin rief bei einer Konzentration von ca. 140 g/L einen 50 %igen Effekt hervor. Die Substanzkontrollen beeinflussten die Dehydrogenase von *B. subtilis* ebenfalls stärker als die von *E. coli*. Natriumchlorid rief bei einer Konzentration von > 0.5 mol/L einen 90 %igen Effekt hervor.

Tab. 12: EC-Werte der Chitosane im Dehydrogenase Assay mit *B. subtilis*

EC-Werte der Kurve mit ihren jeweiligen Konfidenzintervallen (in Klammern).

| | EC ₉₀ [mg/L] | EC ₅₀ [mg/L] | EC ₁₀ [mg/L] |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Chitosan A | 11.86 (4.66 - 30.21) | 18.43 (7.00 - 48.56) | 28.64 (10.34 - 79.32) |
| Chitosan B | 10.46 (3.41 - 32.12) | 17.85 (6.21 - 51.33) | 30.47 (11.04 - 84.12) |
| Chitosan D | 11.49 (4.53 - 29.15) | 18.49 (6.70 - 51.04) | 29.76 (9.67 - 91.62) |
| Chitosan Y | 13.66 (6.01 - 31.09) | 22.40 (10.11 - 49.63) | 36.72 (16.68 - 80.85) |

Bei Natriumacetat setzte die Wirkung bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen ein. Der EC₉₀-Wert war bei einer Konzentration von 100 mmol/L erreicht.

**Abb. 27: Dehydrogenaseaktivität der Kontrollen bei *B. subtilis***

Gezeigt wurden die konzentrationsabhängigen Änderungen der Dehydrogenaseaktivität von *B. subtilis* nach Zugabe der Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin oder der Substanzkontrollen Natriumchlorid und Natriumacetat. Die Konzentrationen (auf der Abszisse) der Monomere wurden in g/L und die Konzentrationen der Substanzkontrollen in mM angegeben, die Ordinaten sind äquivalent.

Tab. 13: Korrelationen bei *B. subtilis*

Angegeben wurden die jeweiligen Signifikanzen (p-Werte) und Korrelationskoeffizienten (r-Werte) aus den Korrelationen nach Pearson, bzw. der Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Dehydrogenaseaktivität mit den Eigenschaften der Chitosane. Korreliert wurden die EC-Werte (zusammengefasst in der PCA) mit den dargestellten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Chitosane. DPF: Deacetylierte Einheiten [DP*(1-FA)], Cl: Chloridgehalt, HAC: Essigsäurekonzentration, M-H: Mark-Houwink Konstante, Protein: Proteingehalt

| | PCA | | Pearson | | | | | |
|---------|-------|--------|---------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | p | r | EC90 | | EC50 | | EC10 | |
| | | | p | r | p | r | p | r |
| DPF | 0.040 | -0.960 | 0.217 | -0.783 | 0.077 | -0.923 | 0.036 | -0.964 |
| Cl | 0.009 | -0.991 | 0.081 | -0.919 | 0.003 | -0.997 | 0.033 | -0.967 |
| HAC | 0.131 | 0.869 | 0.029 | 0.971 | 0.062 | 0.938 | 0.192 | 0.808 |
| M.H. | 0.112 | -0.888 | 0.002 | -0.998 | 0.038 | -0.962 | 0.176 | -0.824 |
| Protein | 0.005 | 0.995 | 0.151 | 0.849 | 0.028 | 0.972 | 0.010 | 0.990 |

Ein 50 %iger Effekt war bei einer Konzentration von > 200 mmol/L zu erkennen (Abb. 27). In den Korrelationsuntersuchungen ergaben sich mehrere Korrelationen nach Pearson und durch die PCA zum Niveau $\alpha = 5\%$ (Tab. 13). Besonders der Chloridgehalt und der Proteingehalt ergaben die meisten Korrelationen. Die deutlichste Korrelation (nach Pearson) trat von dem EC_{90} -Wert mit der Mark-Houwink Konstante auf ($r = -0.998$, $p = 0.002$). Eine Korrelation nach Spearman konnte nicht ermittelt werden.

Zusammenfassung der Dehydrogenaseaktivität von *B. subtilis*

Die Chitosane A [0.08] bis D [0.13] zeigten alle eine annähernd gleiche Wirkung auf die Dehydrogenaseaktivität von *B. subtilis* im Vergleich zu *E. coli*. Die Wirkungsspanne erstreckte sich gemessen an den EC_{90} - und EC_{10} -Werten von 10-30 mg/L. Chitosan Y [0.10] wirkte erst in höheren Konzentrationen von 14-37 mg/L. Somit wurde eine 90 %ige Hemmung bei *B. subtilis* schneller als bei *E. coli* erreicht. Gleiches spiegelte sich auch bei den Monomeren und den Substanzkontrollen wider. Besonders Natriumacetat beeinträchtigte die Dehydrogenase bereits bei einer Konzentration von 0.1 M.

3.3.5 Beeinträchtigung der Lumineszenz bei *Vibrio fischeri*

Aus den vier Einzelexperimenten der Versuche mit *V. fischeri* und den Chitosanen in unterschiedlicher Dosierung ergaben sich gemittelte Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (Abb. 28) mit den zugehörigen Konfidenzintervallen und EC-Werten (Tab. 14). Die Wirkungsspanne (mit einer Leuchtleistung von ca. 10 – 90 %) war bei allen Chitosanen deutlich breiter im Vergleich zu den übrigen bakteriellen Tests. Bei Chitosan A [0.08] erstreckte sich ein effektiver Konzentrationsbereich von 0.1 mg/L bis 230 g/L. Die mittleren effektiven Konzentrationen lagen bei 0.13 g/L Chitosan A [0.08] (Tab. 14). Chitosan B [0.02] hingegen war bei Konzentrationen von 0.03 mg/L bis 3.1 g/L wirksam mit einer mittleren effektiven Konzentration von 9 mg/L. Die Ergebnisse der Einzelexperimente von Chitosan B [0.02] wichen stark voneinander ab. Insbesondere das erste Experiment (B1) zeigte eine untypische Kurvenform (Abb. 29). Diese Diversität konnte durch das gewählte Modell nicht ausreichend flexibel abgebildet werden, woraus in der Gesamtschätzung aus den Einzelkurven ein besonders breites Konfidenzintervall für Chitosan B [0.02] resultierte. Bei Chitosan D [0.13] erstreckte sich die effektive Konzentration von 1.8 mg/L bis 59.2 g/L. Chitosan X [0.44] besaß von allen getesteten Chitosanen den engsten effektiven Konzentrationsbereich, der von 227 mg/L bis 26.2 g/L reichte. Chitosan Y [0.10] wirkte sich in einem Konzentrationsbereich von 7 mg/L bis 47.6 g/L effektiv auf die Leuchtleistung von *V. fischeri* aus. Der EC_{50} -Wert lag bei einer Konzentration von 0.59 g/L.

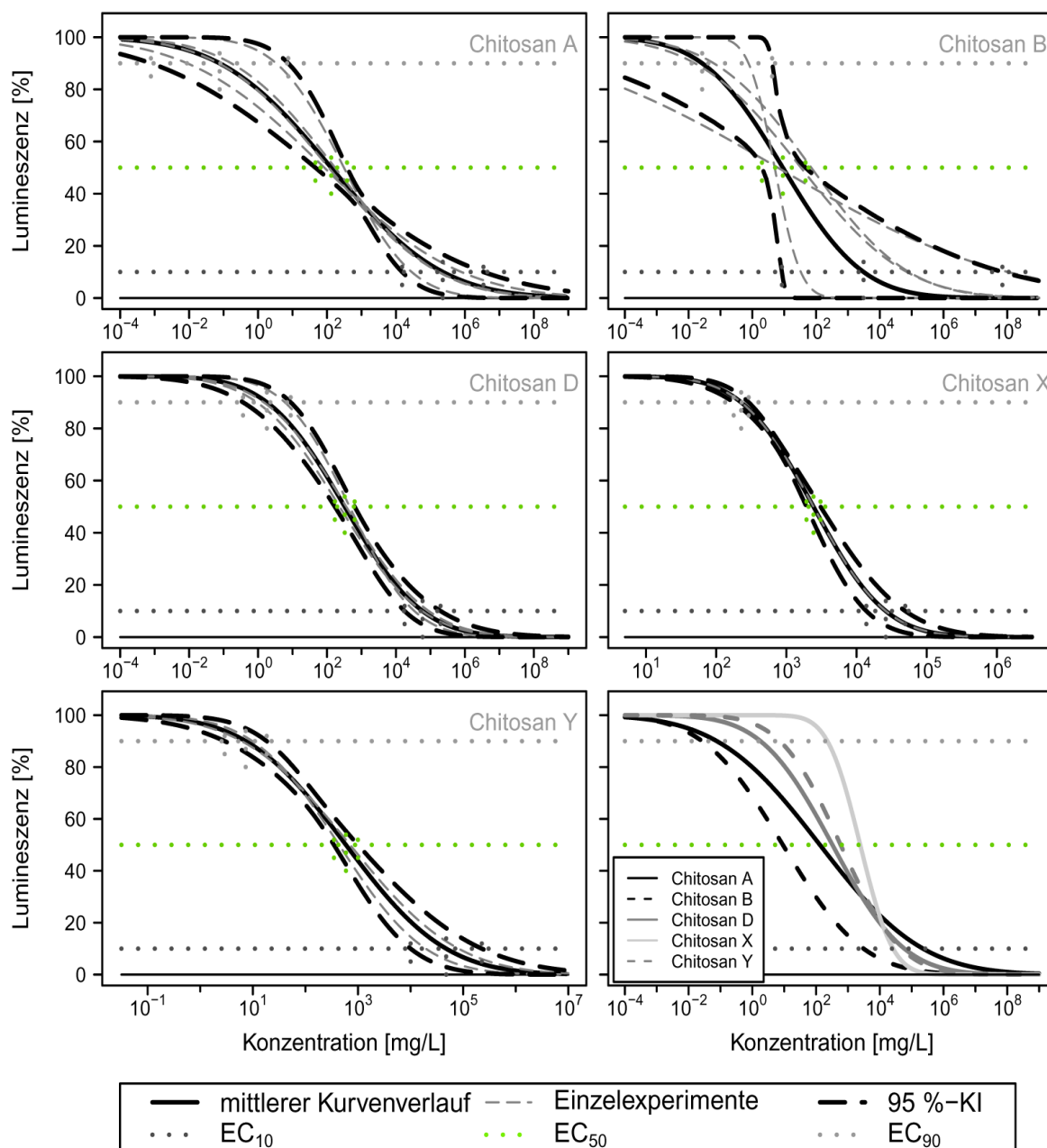


Abb. 28: Veränderung der Leuchtleistung durch Chitosane bei *V. fischeri*

Aus den Ergebnissen der Einzelerperimente (grau gestrichelte Linie) zu der Lumineszenz bei *V. fischeri* ergab sich für jedes Chitosan (angegeben am jeweils rechten oberen Rand) der entsprechende Kurvenverlauf (schwarze Linie) mit dem zugehörigen Konfidenzintervall (gestrichelte schwarze Linie). Die Abszisse wurde dem jeweiligen Wirkungsspektrum des Chitosans angepasst. Die Ordinate wurde für alle Chitosane äquivalent angegeben. Die EC_{50} -Werte und EC_{90} -Werte wurden jeweils in grün bzw. hellgrau gekennzeichnet. In der unteren rechten Graphik wurde zusätzlich der Vergleich aller Chitosane mit eigener Legende abgebildet.

Sowohl bei Chitosan A [0.08] als auch bei Chitosan B [0.02] zeigten die Einzelerperimente stark voneinander abweichende Kurvenformen, was sich in den breiten Konfidenzintervallen widerspiegelte. Chitosan X [0.44] hingegen lag aufgrund der begrenzten Ressource nur ein und Chitosan Y [0.10] zwei Einzelerperimente zugrunde. Die Kontrollen basierten wiederum auf vier Einzelerperimenten, die eine genaue Abschätzung des Kurvenverlaufs ermöglichten (Abb. 30).

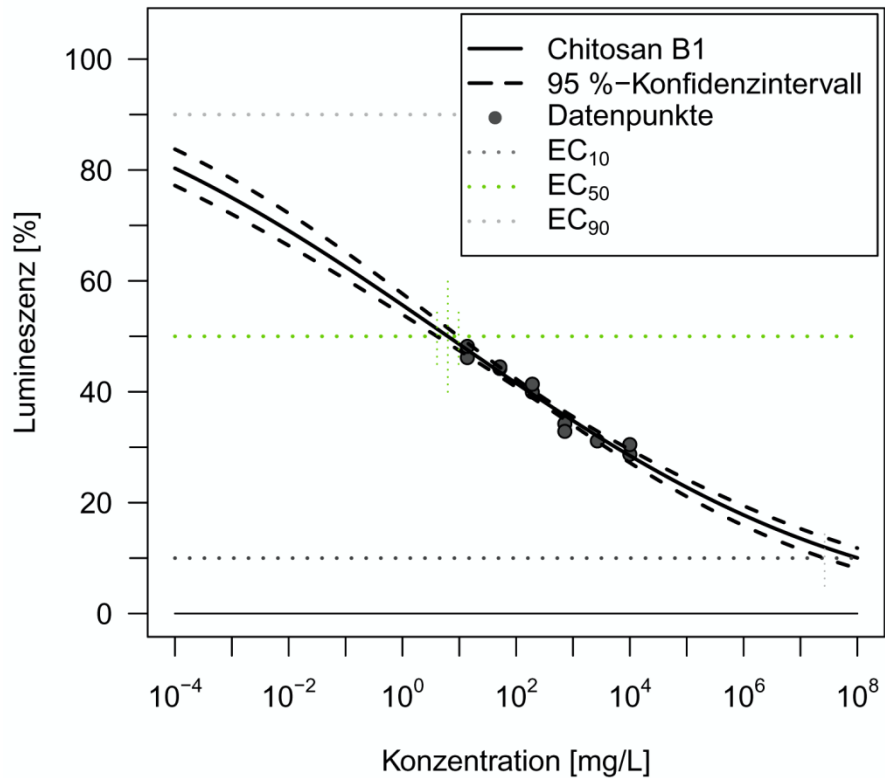


Abb. 29: Schätzung des Kurvenverlaufs von Chitosan B [0.02]

Ergebnisse eines Einzelexperimentes bei der Lumineszenz von *V. fischeri* nach Zugabe von Chitosan B [0.02]. Der Kurvenverlauf der Konzentrations-Wirkungskurve (schwarze Linie) wurde anhand der experimentell erlangten Datenpunkte (dunkelgraue Punkte) abgeschätzt. Das 95 %-Konfidenzintervall wurde gestrichelt dargestellt. Die EC-Werte wurden als gestrichelte Linien dargestellt. EC₁₀: dunkelgrau, EC₅₀: grün, EC₉₀: hellgrau

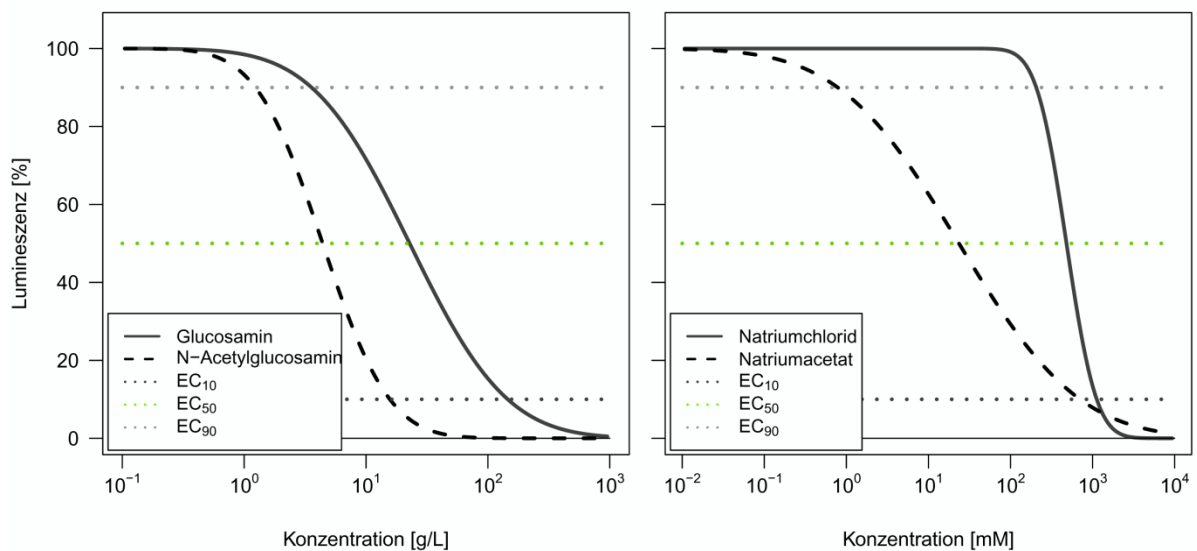


Abb. 30: Änderung der Leuchtleistung bei *V. fischeri*

Dargestellt wurde die konzentrationsabhängige Veränderung der Leuchtleistung nach Zugabe der Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin bzw. der Substanzkontrollen Natriumchlorid und Natriumacetat. Die Konzentrationen der Monomere wurden in g/L und die der Substanzkontrollen in mM entsprechend dem Wirkungsspektrum angegeben. Die Ordinate der Substanzkontrollen entspricht der Ordinate der Monomere und wurde für beide gemeinsam am linken Rand angegeben. Die EC₁₀-, EC₅₀- und EC₉₀-Werte wurden jeweils als dunkelgraue, grüne und hellgraue gepunktete Linien dargestellt.

Die Wirkungsbereiche waren deutlich schmaler als die der Chitosane. Sie lagen bei Glucosamin zwischen 4 und 146 g/L und bei N-Acetylglucosamin zwischen 1 und 16 g/L. Die mittlere effektive Konzentration bei Glucosamin lag bei 22.8 g/L und bei N-Acetylglucosamin bei 4.4 g/L. Natriumchlorid verfügte über einen schmalen Wirkungsbereich zwischen Konzentrationen von 0.2 und 1.1 M mit einer mittleren effektiven Konzentration von 0.48 M. Natriumacetat war hingegen in einem breiten Bereich von 0.8 bis 706 mM mit einer mittleren effektiven Konzentration von 24 mM wirksam.

Tab. 14: EC-Werte bezogenen auf die Leuchtleistung

Die Konfidenzintervalle der Kurve an der Stelle des EC-Werts wurde in Klammern aufgeführt. Die Konzentrationen wurden für EC₉₀ in mg/L und für EC₅₀ sowie EC₁₀ in g/L angegeben.

| | EC ₉₀ [mg/L] | EC ₅₀ [g/L] | EC ₁₀ [g/L] |
|------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| Chitosan A | 0.08 (0.00078 - 7.51) | 0.13 (0.05 - 0.38) | 228.1 (15.09 - 3448.5) |
| Chitosan B | 0.03 (0 - 4.17) | 0.01 (0.002 - 0.05) | 3.10 (0.01 - 138089) |
| Chitosan D | 1.80 (0.37 - 8.85) | 0.33 (0.17 - 0.63) | 59.18 (17.83 - 196.64) |
| Chitosan X | 226.73 (177.56 - 290.48) | 2.44 (1.93 - 3.07) | 26.15 (13.81 - 49.49) |
| Chitosan Y | 7.30 (2.91 - 18.36) | 0.59 (0.35 - 1.00) | 47.62 (10 - 226.49) |

Aus den Korrelationsstudien ging hervor, dass ausschließlich bei einer Korrelation nach Pearson eine signifikante Korrelation der EC-Werte 50 und 90 mit dem Acetylierungsgrad zum Niveau $\alpha = 5\%$ auftrat ($r = 0.984$, $p = 0.002$, $r = 0.973$, $p = 0.005$).

Zusammenfassung der Beeinträchtigung der Leuchtleistung von *V. fischeri*

Die Wirkung der Chitosane erstreckte sich über einen weiten Bereich und umfasste zwei bis sieben dekadische Einheiten. So erstreckte sich die Wirkungsspanne von EC₉₀ - EC₁₀ gemessen von 0.03 mg/L bis 228 g/L. Chitosan X [0.44] hatte dabei mit zwei dekadischen Einheiten die engste Wirkungsspanne. Chitosan B [0.02] wirkte im Vergleich der Chitosane am stärksten hemmend auf die Leuchtleistung. Allerdings wirkte Chitosan B [0.02] in den Einzelexperimenten nicht immer einheitlich, sondern zeigte eine große Variabilität.

3.3.6 Zusammenfassung der Wirksamkeit der Chitosane auf Mikroorganismen

Bei der Auswertung der Mikroorganismen (hier: Prokaryoten und Schimmelpilze) fiel auf, dass bei Untersuchungen mit Pilzen nur geringe Effekte festgestellt werden konnten und dies ausschließlich bei Chitosan Y [0.10]. Auch die Ergebnisse aus dem bakteriellen Bewuchs

einer chitosanbehandelten Oberfläche ließen nur einen geringen Effekt des Chitosans erkennen. In den Vergleich gingen daher alle prokaryotischen Testsysteme ein, die mit löslichem Chitosan behandelt wurden. Die Ergebnisse der Trübungsmessung wurden dabei auf die Messung nach 48 Stunden bezogen. Aufgrund zu geringer Materialvorkommen konnte Chitosan X [0.44] nicht in dem Dehydrogenaseassay getestet werden. In den Proliferationsuntersuchungen konnte keine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zu Chitosan X [0.44] festgestellt werden. Selbst die maximal lösliche Konzentration erzielte keinen Effekt auf das bakterielle Wachstum in diesem Test.

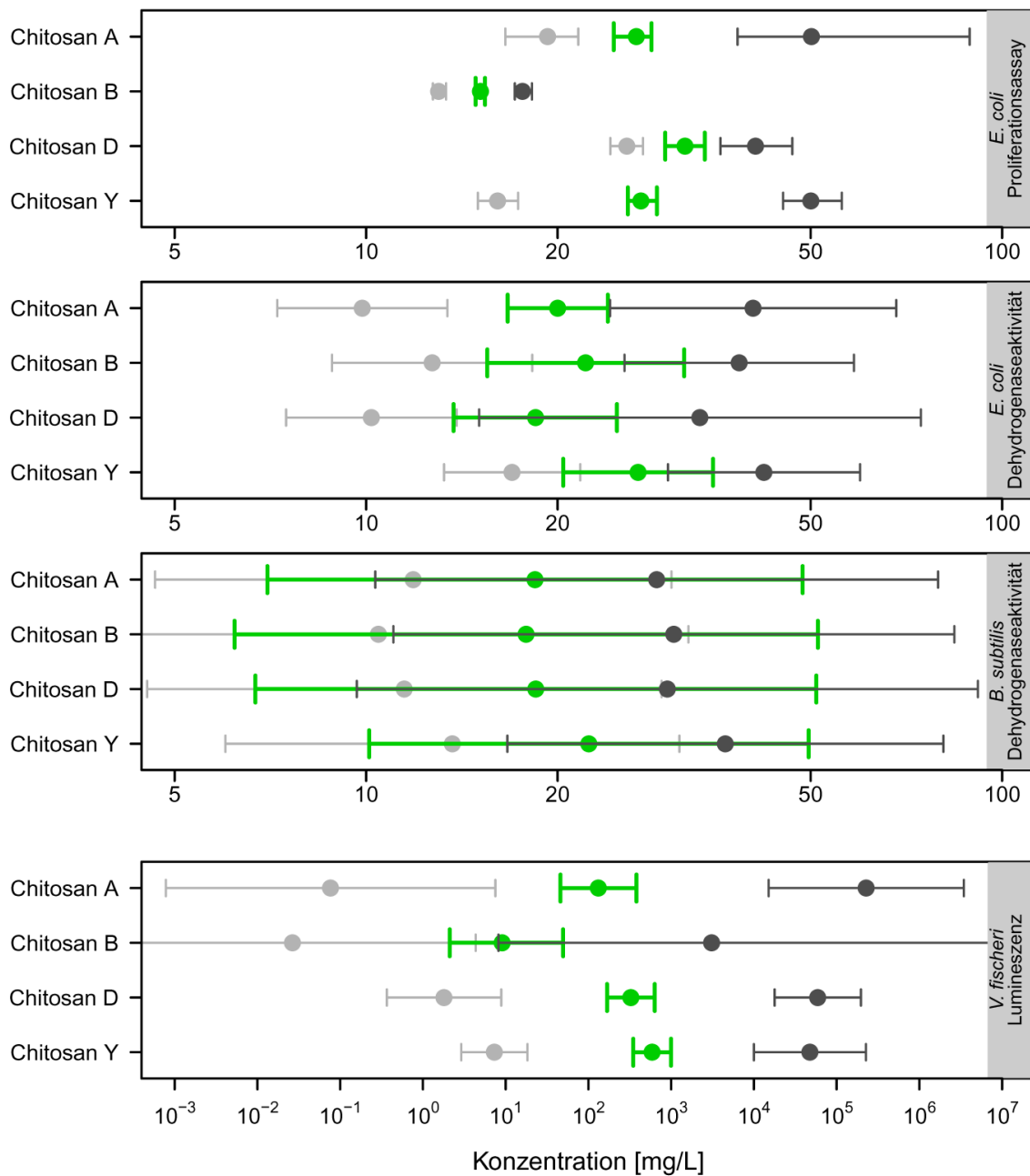


Abb. 31: EC-Werte der bakteriellen Testsysteme gruppiert nach Testsystemen

Die EC-Werte wurden mit ihrem jeweiligen Konfidenzintervall für jedes bakterielle Testsystem (Angabe am rechten Rand) in mg/L angegeben. Die Angaben auf der Abszisse der verschiedenen Textsysteme ist äquivalent, ausschließlich die weite Wirkungsspanne der Chitosane bei dem Testsystem mit *V. fischeri* machte eine Anpassung der Abszisse für den Lumineszenztest erforderlich. hellgrau: EC₉₀, grün: EC₅₀, dunkelgrau: EC₁₀

Ausschließlich im Test mit *V. fischeri* war es möglich, einen Kurvenverlauf zu schätzen. Daher wurde auf eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Chitosan X [0.44] verzichtet. Im Vergleich der EC-Werte aus den Testsystemen (Abb. 31 und Tab. 15) war zu erkennen, dass die Wirkungen der Chitosane im Proliferationsassay am deutlichsten zu differenzieren waren. Die Wirkungsbereiche waren eng abgegrenzt und durch die sich nicht überschneidenden Konfidenzintervalle signifikant verschieden.

Die EC-Werte der Dehydrogenasetests streuten breiter und waren weniger voneinander abzugrenzen, wobei die Streuung bei *B. subtilis* größer war als bei *E. coli*. *V. fischeri* reagierte am sensibelsten bereits auf geringe Konzentrationen der Chitosane. Gleichzeitig war der Wirkungsbereich so breit, dass die mittleren Konzentrationen erst viel später erreicht wurden als bei den übrigen Testsystemen.

Tab. 15: EC₅₀-Werte der bakteriellen Testsysteme

Hervorgehoben (fett) wurden die niedrigsten EC₅₀-Werte [mg/L] pro Chitosan. Zusätzlich wurde pro Testsystem die Reihenfolge der Chitosane (ausschließliche Angabe des Buchstaben) entsprechend der EC₅₀-Werte (aufsteigend) in der letzten Spalte angegeben.

| [mg/L] | Chitosan A | Chitosan B | Chitosan D | Chitosan Y | Reihenfolge |
|---|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| <i>B. subtilis</i> Dehydrogenase | 18.43 | 17.85 | 18.49 | 22.4 | BADY |
| <i>E. coli</i> Dehydrogenase | 20.01 | 22.14 | 18.47 | 26.77 | DABY |
| <i>E. coli</i> Trübungsmessung (48h) | 26.62 | 15.13 | 31.74 | 27.06 | BAYD |
| <i>V. fischeri</i> Lumineszenz | 132.25 | 9.08 | 326.52 | 589.78 | BADY |

In Bezug auf die Chitosane (Abb. 32 und Tab. 15) ließ sich keine offensichtliche Gesetzmäßigkeit ableiten. Abhängig vom Testsystem wirkten sich die Chitosane unterschiedlich aus. Auch ein Trend zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie Molekulargewicht oder Acetylierungsgrad, ließ sich nicht erkennen. Bei dem Proliferationsassay mit *E. coli* zeigte Chitosan B [0.02] die stärkste Wirkung, wohingegen bei dem Dehydrogenase Assay mit *E. coli* Chitosan A [0.08] und D [0.13] eine stärkere Wirkung als Chitosan B [0.02] zeigten. Allerdings war zu erkennen, dass im Vergleich innerhalb einer Chitosanserie der EC₅₀-Wert von Chitosan B [0.02] am geringsten von einem zum anderen Assay variierte. Im Vergleich der EC₅₀-Werte (Tab. 15) wurde dieser Aspekt besonders

deutlich. Jedes Chitosan erzeugte bei einem anderen Test die stärkste Wirkung. Die Untersuchungen der Dehydrogenaseaktivität machten deutlich, dass hierbei weder die Bakterienart (zwei Testsysteme mit *E. coli*) noch das Testsystem (Dehydrogenaseuntersuchungen mit zwei Bakterienstämmen) die Wirksamkeit des Chitosans beeinträchtigten. Dennoch zeigte Chitosan B [0.02] tendenziell die stärkste negative Wirkung auf die untersuchten Bakterien, gefolgt von Chitosan A [0.08]. Chitosan D [0.13], gefolgt von Chitosan Y [0.10], hatte die geringste hemmende Wirkung auf Bakterien.

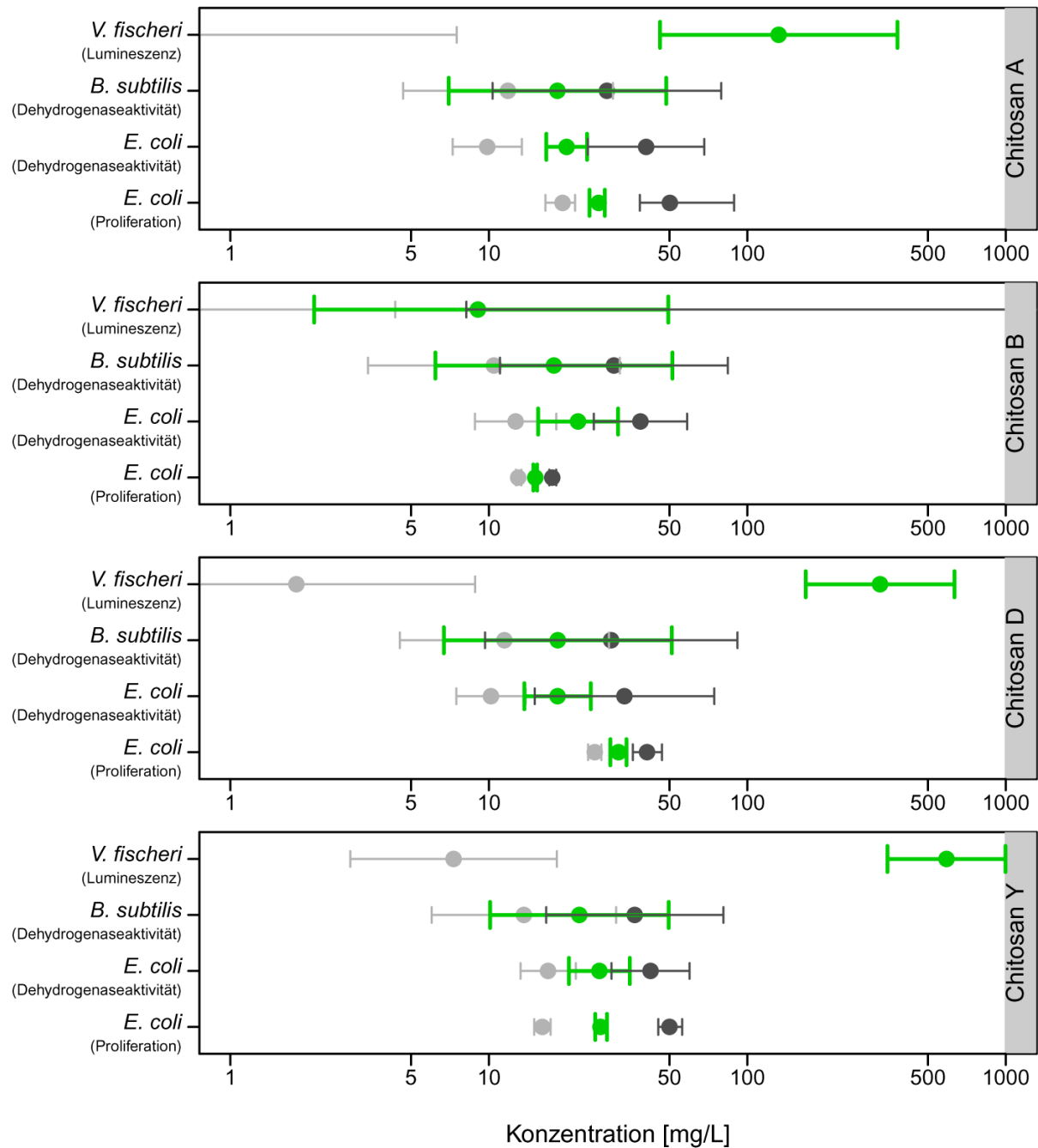


Abb. 32: EC-Werte der bakteriellen Testsysteme gruppiert nach Chitosanen

Für jedes Chitosan (Angabe am rechten Rand) wurden die EC-Werte mit ihren Konfidenzintervallen in mg/L angegeben, wobei sie dem jeweiligen Organismus und Testsystem zugeordnet wurden. Aufgrund der weiteren Wirkungsspanne der Chitosane im Lumineszenztest, konnten diese EC-Werte nur anteilig dargestellt werden. Dunkelgrau: EC₉₀, grün: EC₅₀, hellgrau: EC₁₀

Eine Rangkorrelation nach Spearman dieser Reihenfolge mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Chitosane erbrachte jedoch keine signifikanten Korrelationen.

3.4 Wirkung gelöster Chitosane auf eukaryotische Testsysteme

3.4.1 Einfluss auf die Arealdominanz von *Lemna minor*

Die flächenwachstumshemmende Wirkung der unterschiedlichen Chitosane erstreckte sich über ein breites Spektrum von 0.1 mg/L bis hin zu 1.7 g/L. Anhand des Kurvenverlaufs war zu erkennen, dass die kurzkettigen Chitosane X [0.44] und Y [0.10] keine Hormeseffekte bei *L. minor* hervorriefen (Abb. 33). Sie zeigten in den geringeren Konzentrationen allerdings die stärksten Veränderungen. So bewirkten Chitosan X [0.44] bereits bei 0.1 mg/L und Chitosan Y [0.10] bei 0.15 mg/L eine 10 %ige Hemmung der Ausbreitung der Oberfläche von *L. minor*. Gemessen an den EC₅₀-Werten (Tab. 16) ergab sich eine Reihenfolge der Wirkung der Chitosane von Chitosan X [0.44] mit der stärksten Wirkung zu Chitosan Y [0.10], Chitosan D [0.13] und Chitosan A [0.08] hin zu Chitosan B [0.02] mit der geringsten Wirkung.

Tab. 16: EC-Werte des Flächenwachstums von *L. minor*

EC-Werte wurde mit ihrem jeweiligen Konfidenzintervall (in Klammern) in mg/L angegeben.

| | EC ₉₀ [mg/L] | EC ₅₀ [mg/L] | EC ₁₀ [mg/L] |
|------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Chitosan A | 0.19 (0.10 - 0.37) | 4.41 (3.16 - 6.09) | 234.71 (91.86 - 589.96) |
| Chitosan B | 1.11 (0.69 - 1.68) | 16.17 (11.2 - 23.88) | 1747.1 (814.42 - 4645.64) |
| Chitosan D | 2.15 (1.13 - 2.48) | 3.01 (2.54 - 3.39) | 8.17 (4.73 - 31.8) |
| Chitosan X | 0.1 (0.06 - 0.27) | 0.55 (0.34 - 0.76) | 2.98 (0.75 - 5.48) |
| Chitosan Y | 0.15 (0.06 - 0.28) | 2.69 (2.08 - 3.51) | 47.8 (24.42 - 109.6) |

Die Kurvenverläufe waren bei allen Chitosanen nahezu gleich, mit Ausnahme von Chitosan D [0.13]. Dieses begann erst bei höheren Konzentrationen hemmend zu wirken. So lag der EC₉₀-Wert (= 10 %ige Hemmung) bei 2.15 mg/L. Allerdings hatten anschließend geringe Konzentrationsveränderungen eine starke Auswirkung auf die Arealdominanz von *L. minor*. Chitosan D [0.13] erreichte bereits bei einer Konzentration von 8.2 mg/L eine 90 %ige Hemmung (= EC₁₀) und war damit in der Wirkung vergleichbar mit Chitosan X [0.44], welches einen EC₁₀-Wert von 3 mg/L aufwies.

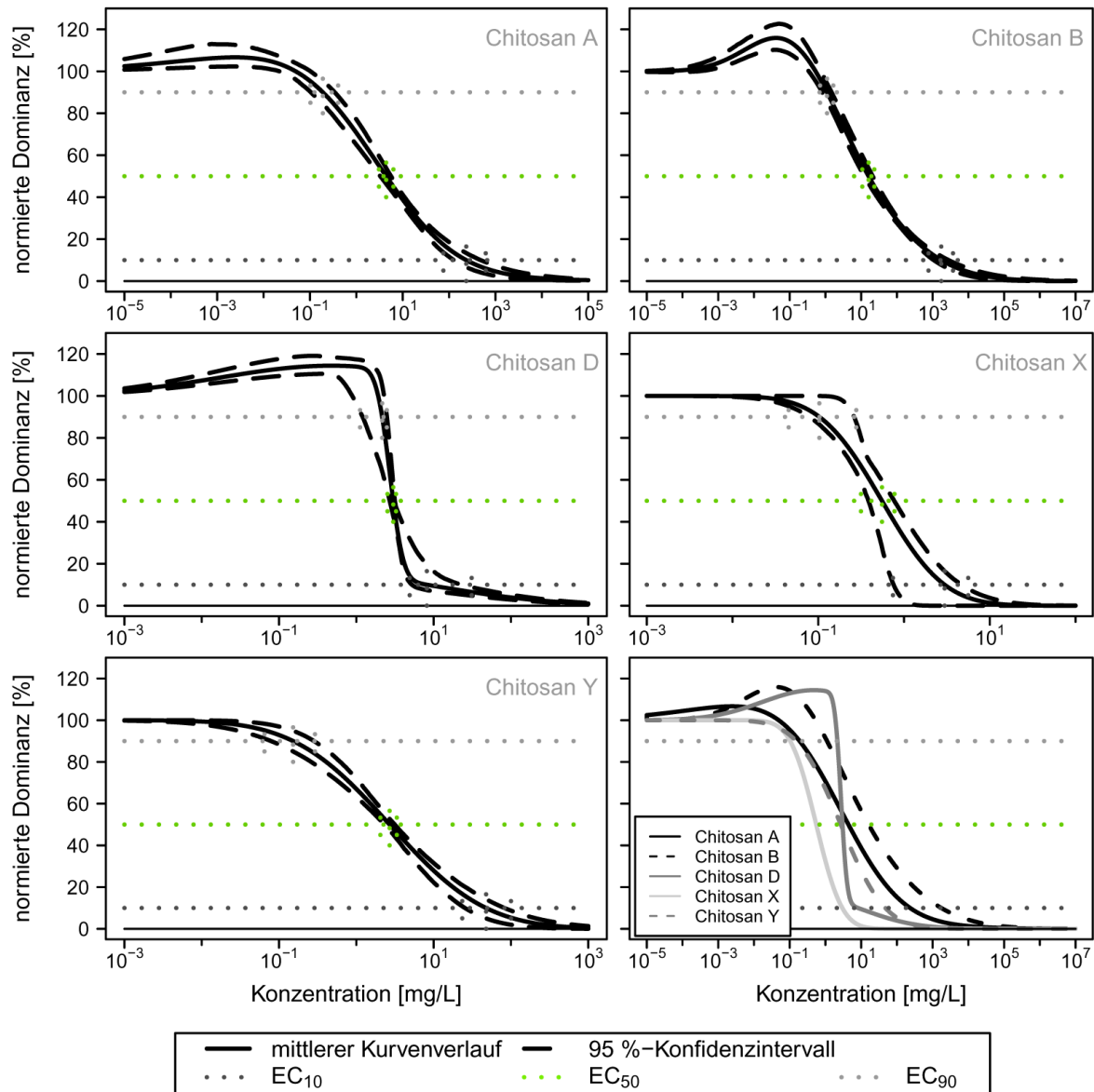


Abb. 33: Veränderung der Arealdominanz von *L. minor* unter Chitosan-Einfluss.

Der Kurvenverlauf (schwarze dicke Linie) für die Konzentrations-Wirkungsbeziehung nach Behandlung mit Chitosan wurde berechnet aus den Ergebnissen von mindestens drei Einzelexperimenten und wurde mit dem zugehörigen Konfidenzintervall (gestrichelte dicke schwarze Linie) dargestellt. Jedes Chitosan (angegeben in der jeweils oberen rechten Ecke) verfügt über ein eigenes Wirkungsspektrum (dargestellt in mg/L), weshalb die Abszisse entsprechend angepasst wurde. Die Ordinate wurde für alle Chitosane gleich angegeben. Ein Vergleich aller Chitosane wurde in der rechten unteren Graphik (mit eigener Legende) abgebildet. Die EC₁₀-, EC₅₀- und EC₉₀-Werte wurden jeweils in hellgrau, grün bzw. dunkelgrau gekennzeichnet.

Aus den Korrelationsstudien ging hervor, dass nach allen drei Vorgehensweisen eine signifikante Korrelation der EC-Werte mit dem Muster der Acetylierung zum Niveau $\alpha = 5\%$ auftrat (PCA: $r = -0.928$, $p = 0.023$; Pearson: EC₁₀: $r = -0.928$, $p = 0.023$, EC₅₀: $r = -0.965$, $p = 0.008$; Spearman: EC₁₀: $r = -1$, $p = 0.017$). In der Rangkorrelation nach Spearman konnte eine zusätzliche Korrelation des EC₁₀-Wertes mit dem Acetylierungsgrad ermittelt werden ($r = -1$, $p = 0.017$).

Die Monomere riefen im Gegensatz zu den kurzkettigen Chitosanen X [0.44] und Y [0.10] wieder einen Hormeseffekt (wie auch die übrigen Chitosane) hervor. Eine hemmende Wirkung trat erst bei höheren Konzentrationen auf und zeigte Ähnlichkeiten zu der von Chitosan D [0.13] (Abb. 34). Glucosamin hatte einen Wirkungsbereich von 37-73 mg/L und N-Acetylglucosamin einen Wirkungsbereich, der sich von 0.3-2.9 g/L erstreckte. Die Substanzkontrollen wirkten in Konzentrationsbereichen von 4-135 mM (NaCl) und 0.5-9 mM (Natriumacetat).

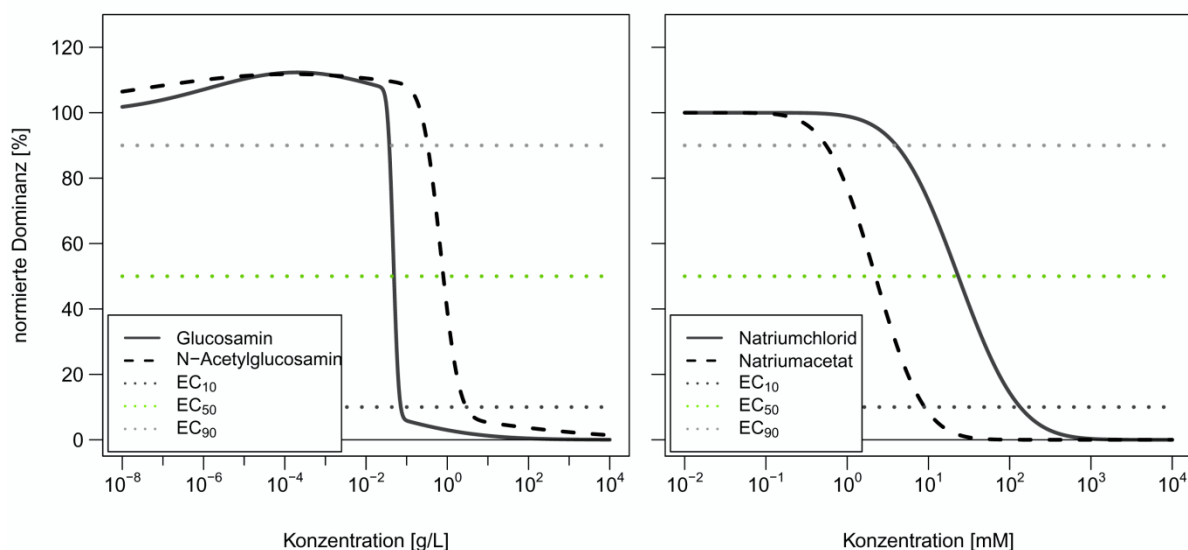


Abb. 34: Einfluss der Monomere und Substanzkontrollen auf das Flächenwachstum

Dargestellt wurde die konzentrationsabhängige Veränderung des prozentualen Flächenwachstums nach Zugabe der Monomere Glucosamin und N-Acetylglucosamin bzw. der Substanzkontrollen Natriumchlorid und Natriumacetat. Die Konzentrationen der Monomere wurden in g/L und die der Substanzkontrollen in mM entsprechend dem Wirkungsspektrum auf der Abszisse angegeben. Die Ordinate der linken Graphik gilt sowohl für die Monomere als auch für die Substanzkontrollen. Die EC₁₀-, EC₅₀- und EC₉₀-Werte wurden jeweils als dunkelgraue, grüne und hellgraue gepunktete Linien dargestellt.

Im morphologischen Vergleich fiel auf, dass Chitosan A [0.08] (Abb. 35) bereits ab einer Konzentration von 0.4 g/L Nekroseerscheinungen bei *L. minor* verursachte. Bereiche der Fronds oder auch die gesamte Frondfläche einer Pflanze verfärbte sich gelblich bzw. wurde weiß und durchscheinend (Abb. 35 I und II). Zusätzlich wurden die Pflanzen mit zunehmender Chitosankonzentration kleiner. Erst ab einer Konzentration von 0.01 mg/L war keine Beeinträchtigung der Morphologie erkennbar (Abb. 35 III).

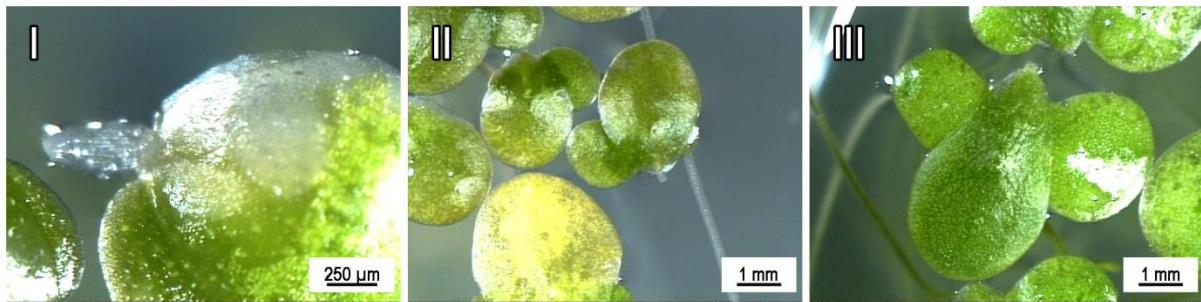


Abb. 35: Chitosan A [0.08] induzierte morphologische Veränderungen bei *L. minor*

Pflanzen von *L. minor* wurden über 1 Woche im Kulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chitosan A [0.08] kultiviert. Chitosankonzentrationen: I: 0.4 g/L, II: 48 mg/L, III: 0.01 mg/L

Unter dem Einfluss von hohen Konzentrationen an Chitosan B [0.02] (von 2.5 g/L) kam es zu untypischen Wuchsformen. Es wurde offenkundig keine Abtrennung der Fronds ausgelöst, bevor daraus wieder Pflanzen bestehend aus drei Fronds hervorgingen. So entstand eine Elterngeneration von Pflanzen, die in mehrere Richtungen mit ihren Tochterpflanzen verwachsen zu sein schienen (Abb. 36 I). Wie auch bei Chitosan A [0.08] kam es mit zunehmender Chitosankonzentration zu vermehrtem Auftreten einer Nekrose und die Pflanzen verloren an Größe (Abb. 36 I und II). Ein annähernd normales Wachstum war erst ab einer Konzentration von 0.01 mg/L wieder erkennbar (Abb. 36 III).

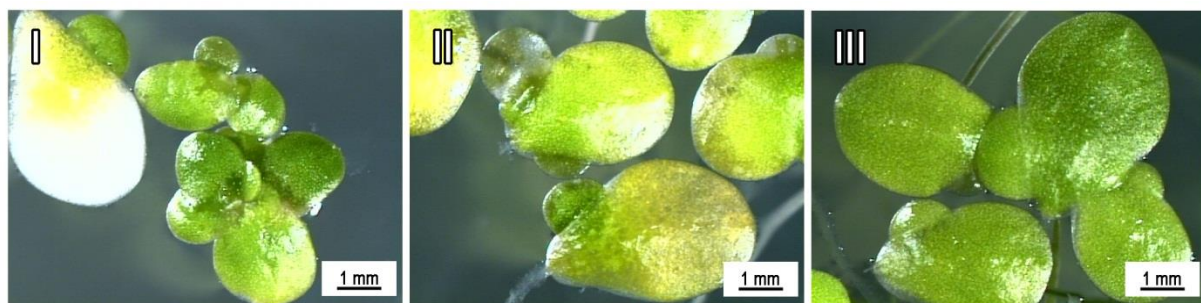


Abb. 36: Chitosan B [0.02] induzierte morphologische Veränderungen bei *L. minor*

Pflanzen von *L. minor* wurden über 1 Woche im Kulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chitosan B [0.02] kultiviert. Chitosankonzentrationen: I: 2.5 g/L, II: 43.5 mg/L, III: 0.01 mg/L.

Chitosan D [0.13] verursachte bereits in niedrigen Konzentrationen von ca. 80 mg/L eine ausgeprägte Nekrose der Mutterpflanzen und minderte das Wachstum der Tochterpflanzen, sodass sie stetig kleiner bis winzig wurden (Abb. 37 I). Zusätzlich war auch hier bei den meisten *Lemna*-Pflanzen eine mangelnde Trennung von Mutter- und Tochterpflanzen zu erkennen (Abb. 37 II). Die Wirkungsspanne von Chitosan D [0.13] in Bezug auf die Morphologie schien allerdings geringer, da bereits ab einer Konzentration von 0.1 mg/L die *Lemna*-Pflanzen ein annähernd normales Wachstum aufwiesen (Abb. 37 III).

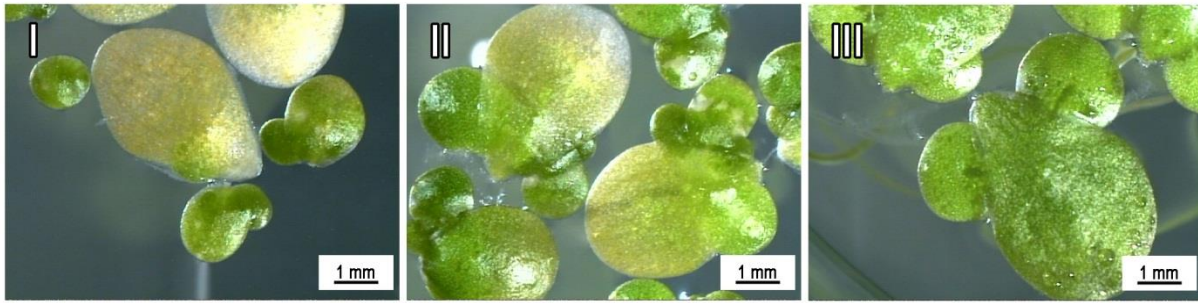


Abb. 37: Chitosan D [0.13] induzierte morphologische Veränderungen bei *L. minor*

Pflanzen von *L. minor* wurden über 1 Woche im Kulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chitosan D [0.13] kultiviert. Chitosankonzentrationen: I: 76 mg/L, II: 14 mg/L, III: 0.1 mg/L

Zusammenfassung der Beeinträchtigung des Flächenwachstums von *L. minor*

Die kurzkettigen Chitosane X [0.44] und Y [0.10] wiesen von allen Chitosanen die stärkste Wirkung auf und zeigten keine Hormese in den geringen Konzentrationen. Chitosan B [0.02] wirkte im Vergleich der Chitosane am wenigsten hemmend auf das Flächenwachstum ein. Bei morphologischen Betrachtungen zeigten die chitosanbehandelten Pflanzen bereits in Konzentrationen zwischen 14-50 mg/L Anzeichen von Chlorose und Nekrose. Die stärksten morphologischen Veränderungen konnten bei Chitosan D [0.13] beobachtet werden.

3.4.2 Flächenwachstum von *Lemna minor* im repeat dose Experiment

Bei dem Vergleich der Morphologie fiel auf, dass in den Versuchsansätzen mit hohen Chitosankonzentrationen (1.25 - 5 g/L) nach vier Wochen Inkubationszeit schleimiges Sekret auftrat, welches vermutlich auf Pilzwachstum zurückzuführen ist. Es trat nur an den Rändern der Fronds auf und nahm mit fallender Konzentration ab. Vereinzelt kam es bei einer Konzentration von 5 g/L auch zu Pilzwachstum auf der Wasseroberfläche. Bei geringeren Dosen von Chitosan unter 80 mg/L war kein Sekret oder Pilzwachstum zu erkennen. Die geringe Größe der Frondflächen und die reduzierte Anzahl der Pflanzen im Medium mit Chitosan im Gegensatz zu den unbehandelten Pflanzen der Kontrollen fiel deutlich auf (Abb. 38). In den chitosanbehandelten Proben befanden sich nur 1/3 bis 1/5 der Pflanzenanzahl im Vergleich zu den Kontrollen. Die *Lemna*-Pflanzen in den Kontrollen wiesen eine gleichmäßige dunkelgrüne Färbung bei einer Größe von ca. 6 mM auf (Abb. 38 A). Bei einer Chitosankonzentration von 2.5 g/L zeigten die Pflanzen, im Gegensatz zu den einwöchigen Experimenten (Abschnitt 3.10), nur geringe Nekroseerscheinungen. Die Pflanzen, die mit Chitosan A [0.08] oder D [0.13] im Medium kultiviert wurden, zeigten allerdings farblose Areale auf den Fronds (Abb. 38 B und D). Mit Chitosan B [0.02] kultivierte Pflanzen wiesen in denselben Chitosankonzentrationen jedoch keine erkennbaren Nekrosen auf (Abb. 38 C). Auffällig war allerdings, dass sämtliche Pflanzen deutlich kleiner waren als die Pflanzen in

den Kontrollen, was sich im Laufe des Experiments immer mehr verstärkte. Unter Einfluss von Chitosan A [0.08] verringerte sich die Größe von durchschnittlich 5 bis 6 mm auf ca. 2 bis 3 mm, durch Chitosan B [0.02] auf ca. 4 mm und nach Zugabe von Chitosan D [0.13] auf eine Größe von ca. 1 bis 2 mm.

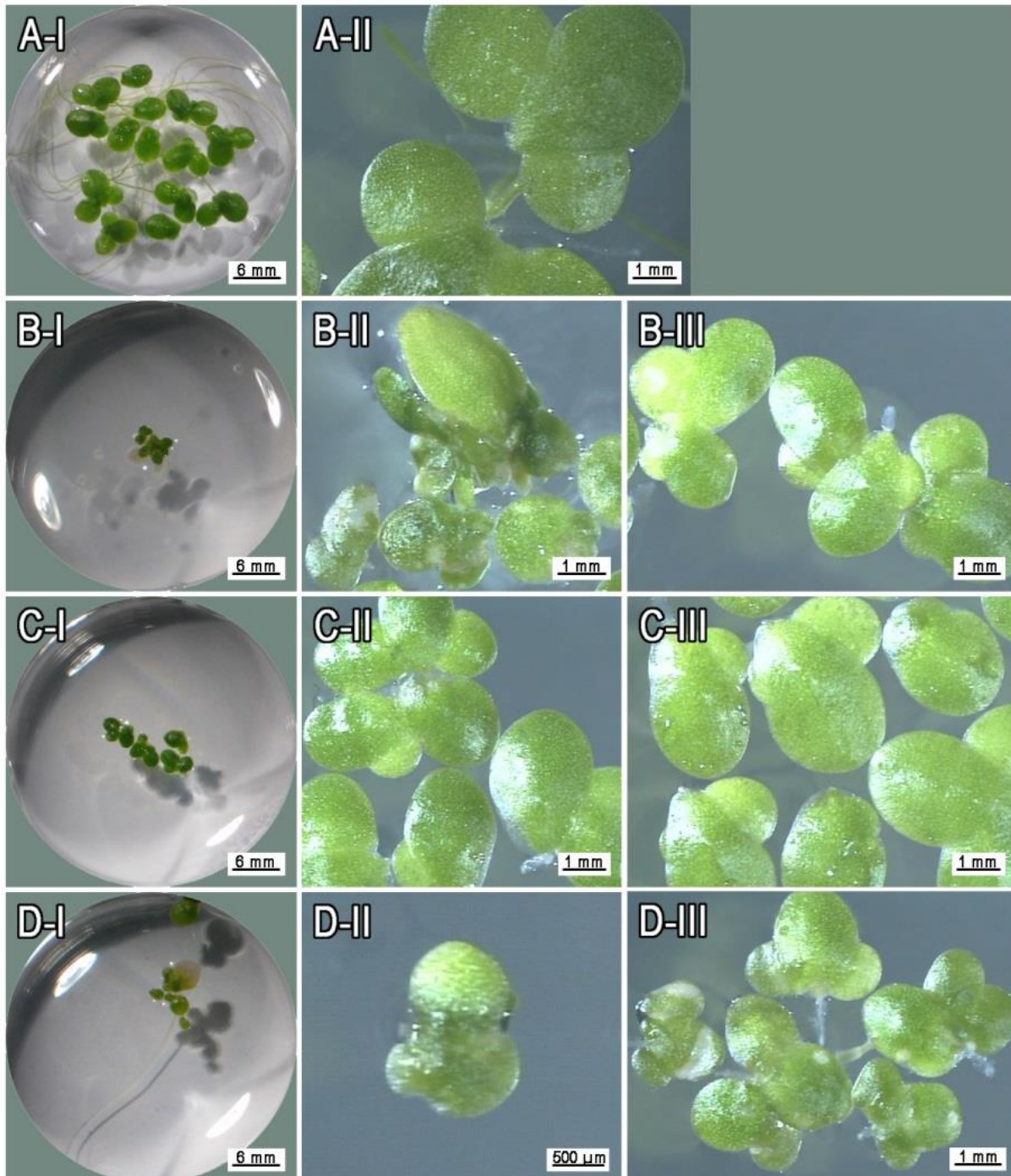


Abb. 38: Morphologische Veränderungen von *L. minor* nach vier Wochen

Pflanzen von *L. minor* wurden über vier Wochen im Kulturmedium mit unterschiedlichen Chitosankonzentrationen kultiviert. Es erfolgte ein wöchentlicher Wechsel des Mediums mit Vereinzelung der Pflanzen. A = Kontrolle, B = Chitosan A [0.08], C = Chitosan B [0.02], D = Chitosan D [0.13]; für B, C und D gelten folgende Chitosankonzentrationen: I: 5g/L, II: 2.5 g/L, III: 0.16 g/L

Gleichzeitig zeigten sich durch die Behandlung mit Chitosan A [0.08] deutliche Änderungen in der Wuchsform. Wie auch bei Chitosan B [0.02] in den einwöchigen Experimenten fehlte es an einer Trennung der Tochter- von den Mutterpflanzen. Hinzu kam, dass hier die Fronds senkrecht zur Oberfläche wuchsen. Bei geringeren Konzentrationen von 0.16 mg Chitosan pro mL Medium waren die Wuchsformen der *Lemna*-Pflanzen, die mit Chitosan A [0.08] oder B [0.02] behandelt wurden, unter Missachtung der Größe, in Färbung und Wuchsform vergleichbar mit dem Aussehen der Kontrollpflanzen (Abb. 38 B-III, C-III). Nur die auf Chitosan D [0.13] gewachsenen Pflanzen waren bei gleicher Chitosankonzentration deutlich kleiner und auffallend nekrotisch (Abb. 38 D-III).

Es wurde untersucht, ob sich das Pflanzenwachstum von *L. minor* bei gleichbleibender Chitosankonzentration in dem umgebenden Medium wieder erholte oder ob die Hemmung bestehen blieb. Bei dem statistischen Nachweis einer Adaption innerhalb von vier Wochen war keine Anpassung an die verschiedenen Konzentrationen von 19.5 mg/L – 5 g/L an Chitosane A [0.08], B [0.02] oder D [0.13] zu erkennen (siehe Anhang 09). Bei Chitosan A [0.08] erwies sich das Modell 5 (Formel 9) als optimal.

Formel 9: Lineares Modell 5 mit mehrfacher Wechselwirkung

Dargestellt in -Terminologie

$$y \sim v \cdot k + k \cdot t + v \cdot t \quad \text{random} = \sim 1 | I$$

- y: Bewuchs
- v: Versuch
- t: Zeit
- k: Konzentration
- I: Individuum

In den niedrigen Konzentrationen ließ sich ein Anpassungseffekt bei Chitosan A [0.08] erkennen (Abb. 39). Bei einer Konzentration von 2.44 mg/L kam es zu einer deutlichen Verbesserung des Wachstums nach zwei, drei und vier Wochen. Die Effekte waren zwar nicht signifikant voneinander abzugrenzen, jedoch wurde die Erholung des Pflanzenwachstums bzw. eine Adaption nach vier Wochen insgesamt signifikant nachgewiesen. Gleiches traf auf eine Konzentration von 4.88 mg/L Chitosan A [0.08] zu. Ab einer höheren Konzentration (9.77 mg/L) fand kein Adaptionsprozess bei *L. minor* statt (Abb. 39).

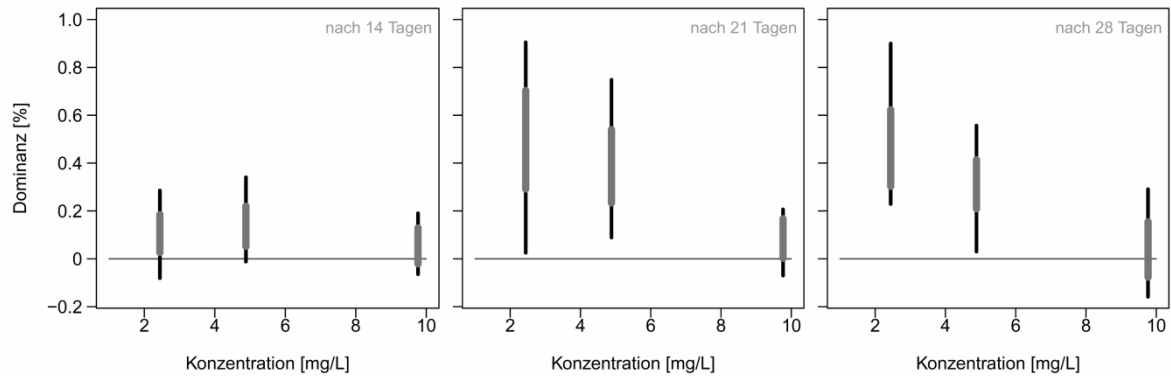


Abb. 39: Variation des Wachstums über 4 Wochen unter Einfluss von Chitosan A [0.08]

Es wurde berechnet ob die Veränderungen des Wachstums von *L. minor* hervorgerufen durch Chitosan A [0.08] innerhalb von vier Wochen einer normalen Streuung (die Null ist im Konfidenzintervall eingeschlossen) entsprachen oder eine Anpassung des Pflanzenwachstums erfolgte (die Null ist nicht vom Konfidenzintervall eingeschlossen). Dargestellt das 95 %- und das 60 %-Konfidenzintervall: Schwarz = 95 % Konfidenzintervall (2.5 % – 97.5 %), grau = 60 % Konfidenzintervall (20 % - 80 %).

Bei Chitosan B [0.02] erwies sich das lineare Modell mit einer zweifachen Wechselwirkung als maßgeblich (Formel 10).

Formel 10: Lineares Modell 3 mit einfacher Wechselwirkung

Dargestellt in \mathbb{R} -Terminologie

$$y \sim v + k \cdot t \quad \text{random} = \sim 1 | I$$

- y: Bewuchs
- v: Versuch
- t: Zeit
- k: Konzentration
- I: Individuum

Es zeigte sich eine signifikante Anpassung des Wachstums von *L. minor* an niedrige Konzentrationen von 2.4 – 9.8 mg/L Chitosan B [0.02] innerhalb von zwei und vier Wochen. Bei einer Konzentration von 9.8 mg/L Chitosan B [0.02] nach drei Wochen war die Adaption nicht signifikant im 95 %-Intervall, jedoch in dem Intervall von 20-80 % nachzuweisen (Abb. 40).

Bei Chitosan D [0.13] erwies sich das umfangreichste Modell nach Formel 8 (Abschnitt 2.6.4) als optimal. Es konnte allerdings keine Adaption innerhalb von vier Wochen nachgewiesen werden. Auch in den niedrigen Konzentrationen fand keine Erholung des Wachstums statt (Abb. 41).

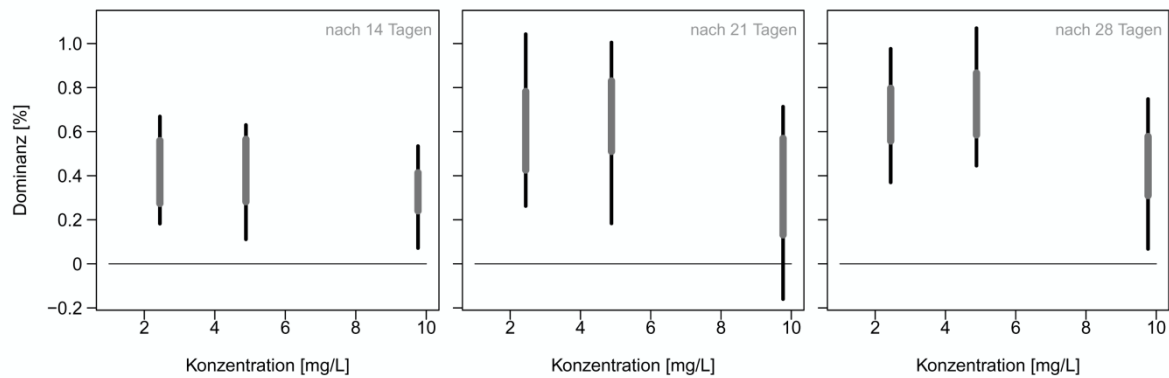


Abb. 40: Variation des Wachstums über 4 Wochen unter Einfluss von Chitosan B [0.02]

Es wurde berechnet, ob die Veränderungen des Wachstums von *L. minor* hervorgerufen durch Chitosan B [0.02] innerhalb von vier Wochen einer normalen Streuung (die Null ist im Konfidenzintervall eingeschlossen) entsprachen oder eine Anpassung des Pflanzenwachstums erfolgte (die Null ist nicht vom Konfidenzintervall eingeschlossen). Dargestellt das 95 %- und das 60 %-Konfidenzintervall: Schwarz = 95 % Konfidenzintervall (2.5 % – 97.5 %), grau = 60 % Konfidenzintervall (20 % - 80 %).

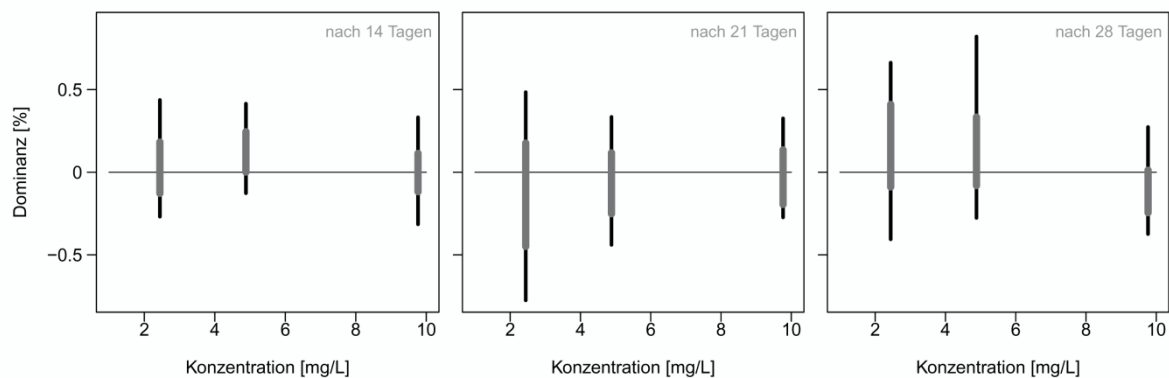


Abb. 41: Variation des Wachstums über 4 Wochen unter Einfluss von Chitosan D [0.13]

Es wurde berechnet, ob die Veränderungen des Wachstums von *L. minor* hervorgerufen durch Chitosan D [0.13] innerhalb von vier Wochen einer normalen Streuung (die Null ist im Konfidenzintervall eingeschlossen) entsprachen oder eine Anpassung des Pflanzenwachstums erfolgte (die Null ist nicht vom Konfidenzintervall eingeschlossen). Dargestellt das 95 %- und das 60 %-Konfidenzintervall: Schwarz = 95 % Konfidenzintervall (2.5 % – 97.5 %), grau = 60 % Konfidenzintervall (20 % - 80 %).

Zusammenfassung des Adaptionsprozesses von *L. minor*

Innerhalb von vier Wochen konnte eine Adaption an geringe Konzentrationen von Chitosan B [0.02] und A [0.08] beobachtet werden. Eine Anpassung an Konzentrationen von Chitosan D [0.13] fand innerhalb von vier Wochen nicht statt. Dieses spiegelte sich in dem Aussehen der Pflanzen wider. *Lemna*-Pflanzen, die in Chitosan B [0.02] gehältert wurden, sahen nach vier Wochen am gesündesten aus, wohingegen mit Chitosan D [0.13] behandelte Pflanzen stark nekrotisch waren. Alle Pflanzen wiesen zudem eine Miniaturisierung auf.

3.4.3 Viabilität der Zelllinie Hep G2 im LDH-Test

In den folgenden Versuchen wurde eine Zellzahl von 200 000 Zellen ausgesät und über 24 Stunden (an)wachsen gelassen, um bestmögliche reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Bei den Inkubationszeiten erwiesen sich vier Stunden als geeignet, da bei einer längeren Inkubationszeit mit Chitosan teilweise ein Film über den Zellen gebildet und damit die Lyse beeinträchtigt wurde. Der Anteil an LDH vor der Lyse entspricht dem freigesetzten LDH-Gehalt durch die Substanzwirkung. Zusammen mit dem LDH-Gehalt nach der Zelllyse wird der Gesamt-LDH-Gehalt beziffert. Dieser sollte sich nicht von dem der Kontrollen unterscheiden. Durch die Filmbildungen oder Ausfällungen bei hohen Konzentrationen der eingesetzten Substanzen kam es zu hohen LDH-Verlusten. Hierdurch ging der Bezug verloren und es war nicht möglich zu unterscheiden, ob der fehlende LDH-Anteil durch Einwirken der Substanz freigesetzt oder erst nach der Lyse der Zellen freigesetzt worden wäre. Aufgrund des neutralen pH-Wertes variierte das Löslichkeitsverhalten der Chitosane, sodass nur eine Nominalkonzentration angegeben werden konnte und die Ergebnisse von Versuch zu Versuch stark schwankten (Anhang 10). Hierdurch war es nicht möglich, ein passendes Modell zur Anpassung einer Konzentrations-Wirkungskurve zu finden, bzw. EC-Werte zu berechnen.

Trotz der verminderten Löslichkeit ergab die Behandlung der Hep G2-Zellen eine tendenzielle konzentrationsabhängige Steigerung des LDH-Gehaltes bei allen Chitosanen, wohingegen in den Versuchen mit den Monomeren und den Substanzkontrollen nur ein partieller Anstieg des LDH-Gehaltes vor der Lyse zu erkennen war (Abb. 42). Die Kontrollen zeigten konstant einen mittleren LDH-Gehalt vor der Lyse unter 6 %. In den niedrigeren Konzentrationen von Chitosan A [0.08] (< 0.1 g/L) wurden ca. 30 % LDH vor der Lyse freigesetzt. Die Schwankungen können dabei auf eine mögliche Hormesereaktion zurückgeführt werden. In höheren Konzentrationen (> 0.1 g/L) war ein deutlicher Anstieg des LDH-Gehaltes vor der Lyse auszumachen. In den höchsten getesteten Chitosankonzentrationen wurden 80-90 % LDH vor der Lyse freigesetzt. Bei Chitosan B [0.02] variierten die LDH-Gehalte stark, so dass erst in den hohen Konzentrationen (2-4 g/L) ein deutlicher Unterschied zu den übrigen Konzentrationen auszumachen war. Der maximale LDH-Ausstoß vor der Lyse betrug im Mittel 80 %. Die übrige LDH-Freisetzung schwankte zwischen 10 % und 50 % ohne eine konzentrationsabhängige Tendenz zu zeigen. Nur bei der Konzentration von 0.06 g/L war ein deutlich niedriger LDH-Gehalt vor der Lyse von unter 20 % zu verzeichnen.

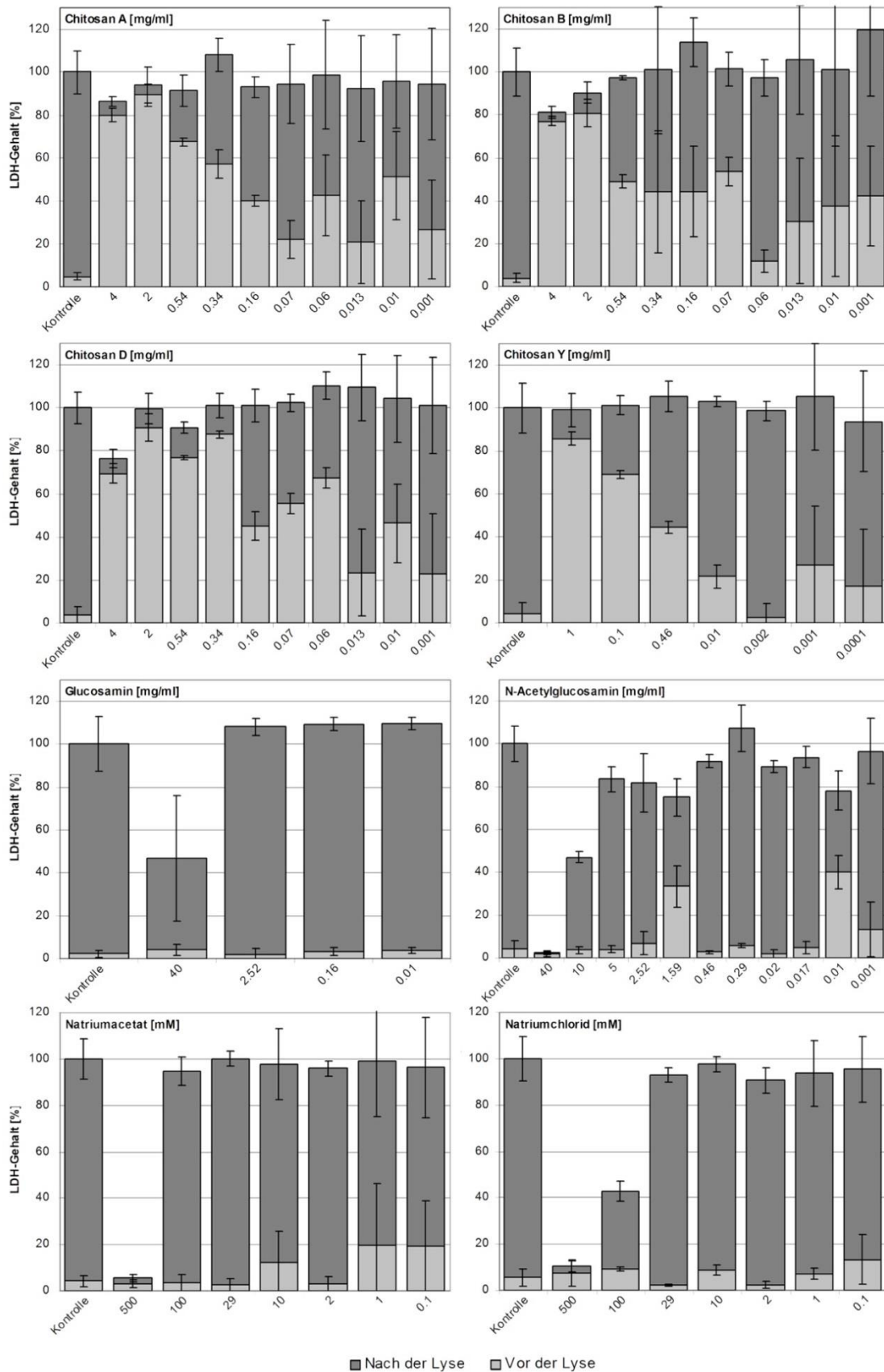


Abb. 42: LDH-Gehalte behandelter Hep G2-Zellen

Vergleichend wurden die unbehandelten Hep G2-Zellen (Kontrollen) gegen die behandelten Hep G2-Zellen aufgetragen. Die LDH-Gehalte wurden vor (hellgrau) und nach (dunkelgrau) der Lyse der Zellen angegeben und bilden zusammen den Gesamt-LDH-Gehalt der untersuchten Hep G2-Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen einer einfachen Standardabweichung.

Unter dem Einfluss von Chitosan D [0.13] schwankten die LDH-Gehalte vor der Lyse in den Konzentrationen < 13 mg/L besonders stark. Es war kein klarer Trend (monotoner Kurvenabfall) entsprechend einer ansteigenden Chitosan D [0.13] Konzentration zu erkennen. Vielmehr verlief der LDH-Ausstoß in Intervallen. Konzentrationen < 13 mg/L bewirkten eine LDH-Freisetzung von 20-45 %. Konzentrationen von 60-160 mg/L führten zu einer LDH-Freisetzung von 45-65 % und Konzentrationen > 160 mg/L bewirkten einen Ausstoß von 70-85 % LDH vor der Lyse.

Nach der Behandlung mit Chitosan Y [0.10] waren ebenfalls starke Schwankungen in den LDH-Gehalten vor der Lyse in den niedrigen Chitosankonzentrationen < 0.002 g/L zu erkennen. Ab einer Konzentration von 0.002 g/L war ein stetiger Anstieg des LDH-Gehalts von 3 % bei einer Konzentration von 0.002 g/L auf 86 % bei einer Konzentration von 1 g/L zu erkennen. Im Vergleich der Chitosane war nur eine grobe Abschätzung der Reihenfolge bezüglich der Wirkung möglich. Gemessen an der maximalen und einer geschätzten mittleren effektiven Wirkung erzeugte Chitosan D [0.13] die größte LDH-Freisetzung vor der Lyse, gefolgt von Chitosan A [0.08] und B [0.02]. Chitosan Y [0.10] war gemessen an den maximalen konzentrationsbedingten Effekten von allen Chitosanen am wirksamsten. Bei einer geschätzten mittleren Effektivität war es jedoch nur geringfügig wirksamer als Chitosan B [0.02].

Bei dem Monomer Glucosamin war über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich kein Anstieg des LDH-Gehaltes vor der Lyse zu erkennen. Ausschließlich in den hohen Konzentrationen von 40 g/L war eine Abnahme des Gesamt-LDH-Gehaltes auf 47 % zu verzeichnen. In den übrigen Konzentrationen schwankte der Gesamt-LDH-Gehalt um 108 %. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei dem Monomer N-Acetylglucosamin. Mit Ausnahme der Konzentrationen 1.59 g/L, 10 und 1 mg/L, die LDH-Gehalte bis zu 40 % aufwiesen, waren die LDH-Gehalte vor der Lyse mit deutlich unter 7 % auf dem Niveau der Kontrollen anzusiedeln. Bei einer Konzentration von 40 g/L N-Acetylglucosamin fiel der Gesamt-LDH-Gehalt auf 2 %. Bei der Substanzkontrolle Natriumacetat waren in allen Konzentrationen durchschnittlich nicht mehr als 20 % LDH-Gehalt vor der Lyse zu finden. In der höchsten Konzentration von 500 mM fiel der Gesamt-LDH-Gehalt auf 6 %, was eine Aussage zu dieser Konzentration nicht möglich machte. Die Substanzkontrolle Natriumchlorid zeigte ähnliche Tendenzen. Der LDH-Gehalt vor der Lyse überschritt den gesamten getesteten Konzentrationsbereich nicht mehr als 13 %. Darüber hinaus lag der

Gesamt-LDH-Gehalt zwischen 90 % und 97 % während in den hohen Konzentrationen von 100 mM und 500 mM ein deutlicher Abfall auf 43 % und 10 % zu verzeichnen war.

Zusammenfassung der LDH-Freisetzung bei Hep G2 Zellen

Der neutrale pH-Wert beeinflusste die Ergebnisse dahingehend, dass sie nicht stabil und somit sehr variabel waren. Eine vermehrte LDH-Freisetzung durch Chitosane ist zwar zu erkennen, jedoch nicht eindeutig zu quantifizieren oder durch ein Modell abzubilden.

4 Diskussion

Vorversuche zeigten, dass der Effekt der Chitosane durch ihre eigenen Parameter (siehe Tab. 4 bis Tab. 6) sowie durch Veränderung der äußeren Einflüsse empfindlich beeinflusst werden konnten. Ebenso bestehen Wechselbeziehungen der Parameter untereinander, so dass diese sich wiederum gegenseitig beeinträchtigen. Allein die Bedingungen der Lagerung, sowie die Wahl der Sterilisationsmethode nahmen Einfluss auf die charakteristischen Parameter wie u.a. das Molekulargewicht bzw. die Kettenlänge und den Acetylierungsgrad (Abschnitt 4.1). Auch der Einsatz in Testsysteme beeinflusste die charakteristischen Parameter und Eigenschaften der Chitosane durch die unterschiedlichen Medien und Puffer. Um diesen Effekt von Testsystem zu Testsystem so gering wie möglich zu halten, wurden alle Chitosane einheitlich vorbehandelt und somit unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen eingesetzt.

Die Verwendung von Chitosan zur Behandlung von Oberflächen zeigte sich als weniger erfolgreich, wobei sowohl die Testsysteme als auch die ausgewählten Arten beeinflussende Faktoren darstellten (Abschnitt 4.2). Die Wirkung auf verschiedene Bakterien ließ sich nicht verallgemeinern oder auf eine Unterteilung in grampositive und gramnegative Bakterien beschränken (Abschnitt 4.3). Im Vergleich zu den eukaryotischen Testsystemen (Abschnitt 4.4) zeigte sich, dass vor allem methodische Aspekte und die Bioverfügbarkeit einen größeren Einfluss als die Zugehörigkeit zu den Eu- oder Prokaryoten hatte (Abschnitt 4.5). Die eingangs aufgestellten Thesen und Fragestellungen werden in den folgenden Abschnitten ausführlich diskutiert und in den einzelnen Fazits sowie im Gesamtüberblick in kondensierter Form wieder gegeben.

4.1 Einflussnahme durch physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Problematik der Chitosanforschung besteht darin, die Ergebnisse von Einzeluntersuchungen aus der Literatur vergleichbar zu machen. Hierzu gehören genaue Angaben der Vorbehandlung der Chitosane sowie eine detaillierte Analyse der physikalisch-chemischen Parameter (Abschnitt 2.3). Dies schließt auch verschiedene Einflussgrößen, wie pH-Wert und Chloridgehalt mit ein, die ebenfalls berücksichtigt und kontrolliert werden sollten [Sorlier et al., 2001].

Die Chitosanchloride wiesen zwar eine deutlich bessere Löslichkeit in Wasser auf als andere Chitosane [Du et al., 2009], machten den Einsatz von Essigsäure zur Stabilisierung des Lösungsverhaltens jedoch nicht unverzichtbar. Durch die einheitliche

Löslichkeitsbehandlung, wie sie unter Abschnitt 2.3.4 beschrieben ist, und Verifizierung der der physikalisch-chemischen Parameter konnte eine maximale Vergleichbarkeit der untersuchten Chitosane sowohl in Bezug auf ihre biologische Wirkung auf unterschiedliche Testsysteme als auch im Vergleich eines Chitosans mit einem anderen, eingesetzt in demselben Testsystem, erzielt werden. Da jede ausgelieferte Chitosanprobe sich bereits allein durch den Herstellungsprozess und die Heterogenität des Ausgangsmaterials immer von der nächsten Charge unterscheidet, wurden nur Chitosane aus einem Produktionsprozess auch als ein und dasselbe Chitosan behandelt.

Durch eine umfangreiche Analyse der möglicherweise beteiligten Parameter wurde eine hohe Transparenz geschaffen. Allerdings konnten viele Analysen aufgrund der geringen verfügbaren Produktionsmenge nur bei den Chitosanchloriden A [0.08], B [0.02] und D [0.13] durchgeführt werden. Eine geringe Menge an Säure ist erforderlich, um Chitosane in Lösung zu bringen, indem die Aminogruppe der Glucosamin-Einheit in die lösliche, „ammonium“-Form ($-\text{NH}_3^+$) überführt wird [Schatz et al., 2003]. Der Einsatz von Essigsäure für die Lösung der Chitosane führt dabei zu einem geringeren Absenken des pH-Wertes im Vergleich zu anderen Säuren, wie Oxal- oder Apfelsäure [Onsosen & Skaugrud, 1990]. Durch die Löslichkeitsbehandlung wurde die Kettenstruktur der Chitosane in die Typ II Konformation (Abb. 4) überführt. Diese Konformation ist flexibler und durch die Protonierung der Aminogruppen deutlich besser löslich. Dies wirkte sich im Zusammenspiel mit den veränderten Medien und Puffern deutlich auf die Stabilität aus, die über einen pH-Wert von 6.2 hinaus weiterhin in Lösung stabil war. Schlussendlich führte dies zu einer deutlichen Verbesserung der Löslichkeitsstabilität in den verwendeten Testverfahren. Im Hinblick auf den Einsatz der Chitosane in Zelltestverfahren mit pH-Werten nahe dem neutralen Bereich bietet es den Vorteil, dass der Einsatz stärkerer Puffer, die wiederum einen negativen Effekt auf das Testsystem zeigen können, nicht erforderlich war. Durch die anschließende Gefriertrocknung nach der Lösung der Chitosane in Essigsäure und die Rehydrierung in Wasser, konnte zusätzlich die Essigsäuremenge um 2/3 reduziert werden, wobei gleichzeitig die Stabilität der Chitosane in Lösung erhalten blieb.

Fazit: Die Standardisierung nicht-derivatisierter Chitosane zum Einsatz in Testsystemen nahe dem neutralen pH-Bereich, erwies sich als die beste Lösung, um Zellsysteme so wenig wie möglich zu beeinträchtigen und trotzdem eine ausreichende Lösung und Bioverfügbarkeit des Chitosans zu gewährleisten.

4.1.1 Lagerung als beeinflussender Faktor

Generell wird bei toxikologischen Messungen ein kurzfristiges Ansetzen der Testsubstanz gegenüber der Verwendung einer Stammlösung empfohlen. Chitosane reagieren jedoch bereits auf geringe Milieuänderungen mit einer veränderten Konformation oder einer Änderung der physikalisch-chemischen Parameter (wie z.B. der Kettenlängenverteilung), was die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen kann. Um diese Variationen von Testsubstanz zu Testsubstanz zu minimieren, wurde die Verwendung von Stammlösungen einem ständig erneuten Ansetzen vorgezogen. In diesem Fall kann bei der Untersuchung des Chitosans von einer absolut gleichen Substanz ausgegangen werden, was die Ergebnisse reproduzierbar machte. Es ist bekannt, dass Chitosane durch Chemikalien, besonders Säuren, zersetzt werden [Aiba, 1994]. Die Behandlung von Chitosanen mit Säuren führt zur Hydrolyse, was Kettenbrüche verursacht [Il'ina & Varlamov, 2004] und damit eine Abnahme des mittleren Molekulargewichts hervorruft. Bei einer Behandlung mit 85 %iger Phosphorsäure bei Raumtemperatur dauert die Hydrolyse zu Oligomeren vier bis sechs Wochen [Hasegawa et al., 1993]. Da der Abbau abhängig von der Reaktionstemperatur, der Säurekonzentration und der Substratkonzentration ist, war es unabdingbar, den Zersetzungsprozess der Chitosane in geringen Essigsäurekonzentrationen und in destilliertem Wasser über einen längeren Zeitraum vorab zu prüfen (Abb. 10) [Jia & Shen, 2002]. Chitosane neigen in wässrigen Lösungen ebenfalls zur Aggregatbildung, die sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig auftreten [Schatz et al., 2003]. Größere Aggregate wurden im Zuge der Analyse aus der Untersuchungslösung entfernt, da sie im Filtrationsprozess die Poren von 2 µm Durchmesser nicht passieren. Hierdurch verschiebt sich die Molekulargewichtsverteilung (und damit das Molekulargewicht) nach unten. Lösen sich die Aggregate soweit auf, dass sie die Poren von 2 µm passieren, verbleiben sie in der Untersuchungslösung und verschieben das Molekulargewicht nach oben. Andernfalls ist davon auszugehen, dass die Kettenverbände der Chitosane bereits nach wenigen Minuten bis Stunden durch das Lösungsmittel (Wasser wie Essigsäure) aufgebrochen werden. Die deutlichsten Abnahmen des mittleren Molekulargewichts ließ sich innerhalb der ersten Tage feststellen, wenn primär die Polymere höheren Molekulargewichts hydrolysiert wurden (Abb. 10). Unter realen Bedingungen traten die Kettenbrüche zwar nicht regelmäßig auf, dennoch ist davon auszugehen, dass sich ein Zerfall immer asymptotisch einem Minimum annähert und nicht linear abfällt.

Experimentell war es in diesem Fall jedoch nicht möglich, gleichzeitig sowohl eine ausreichende Menge Chitosan in Lösung zu gewährleisten als auch den Zerfall zu verhindern. Tendenziell zeigte sich, dass hohe Konzentrationen über die Zeit einer stärkeren Degradation

ausgesetzt sind als niedrige Konzentrationen (Abb. 10), was so nicht zu erwarten war. Geringeren Chitosankonzentrationen steht, bezogen auf die Anzahl der Polymere, ein höheres Aufkommen an freien Protonen gegenüber, so dass eine erhöhte Hydrolyse zu erwarten gewesen wäre. Jedoch wiesen die Trendlinien mit steigender Konzentration eine höhere Steilheit auf (Abb. 10). Dieser Effekt wurde durch das Lösungsmittel Essigsäure noch verstärkt. Die erwartete Stagnation der Degradation durch den Einsatz des Lösungsmittels Wasser blieb ebenfalls aus. So konnten bereits Nguyen und seine Mitarbeiter keinen Zusammenhang zwischen der Säurekonzentration und der Degradationsrate feststellen [Nguyen et al., 2008]. Der Einsatz von Wasser als Lösungsmittel war in diesem Fall möglich, da es sich bei Chitosan D [0.13] um ein Chitosanchlorid und damit ein wasserlösliches Chitosan handelte [Lertworasirikul et al., 2003]. Da Wasser allerdings nicht die Reaktivität einer Säure besitzt, hätte vom Lösemittel ausgehend kaum Hydrolyse stattfinden sollen. Allerdings können eventuell unabhängig vom Lösungsmittel Protonen der Ammoniumgruppen der Glucosamin-Einheiten freigesetzt werden, die eine Zersetzung in wässriger Lösung zusätzlich begünstigen [Rinaudo et al., 1999].

Im Gegensatz zum Lösungsmittel zeigten die verschiedenen Temperaturen einen deutlicheren Einfluss auf die Degradation (Abb. 10). Dies deckt sich mit ähnlichen Studien, nach denen die Degradationsrate mit steigender Temperatur zunimmt [Nguyen et al., 2008]. Überraschend war jedoch, dass eine Lagertemperatur von -80 °C einen vergleichbaren Effekt hervorrief. Die Molekulargewichte fielen nahezu alle innerhalb von 30 Tagen deutlich ab. Möglicherweise war auch dies ein Resultat von Aggregatbildungen (ähnlich Kristallisationskeimen) bei geringen Temperaturen, wodurch beim Wiederauftauen Kettenbrüche entstanden sein konnten. Bei langen Kettenmolekülen wie Zellulose konnte eine Neuordnung der Wasserstoffbindungen zu Makrostrukturen bei geringen Temperaturen nachgewiesen werden [Cai et al., 2008]. Bei einer Lagertemperatur von -20 °C ließ sich nahezu keine Degradation des Chitosans feststellen. Somit waren bei -20 °C und einer Chitosankonzentration von $< 5\text{ g/L}$ optimale Lagerbedingungen sowohl bei wasser- als auch bei säuregelösten Proben gegeben.

Fazit: Stammlösungen werden für den Einsatz in unterschiedlichen Zelltests benötigt, um im späteren Vergleich von einer einheitlichen Chitosanlösung ausgehen zu können. Lösungsmittelunabhängig ist es möglich, Stammlösungen eines Chitosans in Konzentrationen $< 5\text{ g/L}$ herzustellen und diese bei 4 °C bis 20 °C zu lagern, ohne starke Veränderungen des Molekulargewichts tolerieren zu müssen.

4.1.2 Sterilisation als beeinflussender Faktor

Für Chitosane birgt jede Form der Sterilisation immer einen Eingriff in die vorhandene Kettenstruktur und führt zu veränderten physikalischen und chemischen Eigenschaften. In diesem Fall führte es im Besonderen zur Veränderungen der Viskosität und des Molekulargewichts (Abb. 11). Für die Sterilisation von Biomaterialien wird überwiegend der Einsatz von Gammastrahlung proklamiert. Doch auch Gammastrahlung führt mit steigender Strahlendosis zu einer beschleunigten Abnahme des Molekulargewichtes [Lim et al., 1998]. Neben der Sterilisation mit UV- oder Gammastrahlung werden auch chemische Sterilisatoren, wie Alkohol oder Ethylenoxid, verwendet [Marreco et al., 2004]. Gängigere Sterilisationsmethoden wie das Autoklavieren oder Sterilfiltrieren werden hingegen kaum erwähnt. 1995 wurde das Autoklavieren von Rao und Sharma noch als scheinbar ideale Methode der Sterilisation von Chitosanen beschrieben, wohingegen Lim und Mitarbeiter 1999 auf eine Zunahme der Quervernetzung im Zusammenhang mit hohen Temperaturen und Autoklavieren hinwiesen [Lim et al., 1999; Rao & Sharma, 1995]. Wahrscheinlich liegt es besonders an diesen widersprüchlichen Aussagen, dass bei vielen Veröffentlichungen zur antimikrobiellen Wirkung die Angaben zur Sterilisation gänzlich fehlen [Pan et al., 2011]. Doch selbst bei Angaben der Sterilisationsmethode fehlen die Kenngrößen der charakteristischen Parameter nach der Sterilisation [Li et al., 2008b].

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung (Abb. 11) zeigten, dass eine Sterilisation mit UV-Strahlung, ähnlich wie eine Sterilfiltration, das Molekulargewicht nur geringfügig beeinträchtigte. Dieses steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Wasikiewicz und Mitarbeitern, die 2004 die UV-Bestrahlung als eine der effektivsten Methoden zur Degradation von Chitosanen bezogen auf die Reaktionszeit beschreiben [Wasikiewicz et al., 2005]. Allerdings ist die Effektivität der UV-Bestrahlung nicht weiter verifiziert worden, so dass auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht zweifelsfrei von einer Unwirksamkeit der UV-Strahlung auf Chitosane ausgegangen werden kann. Die Methode der Sterilfiltration hingegen führt unstrittig zur Sterilisation der Lösung, wenn sie auch nicht bei hoch viskosen Lösungen anwendbar ist. Bei dieser Methode kann es zum Verlust von höher-verketteten Strukturen und „gecoilten“ Einzelketten kommen. Zwar ist immer ein Materialverlust in Abhängigkeit zur Konzentration einzukalkulieren, da längere Polymerketten die Membranporen blockieren können [Ito et al., 1997], doch sowohl das Molekulargewicht als auch die Viskosität erfuhren in den vorliegenden Untersuchungen nur geringe Beeinträchtigungen durch die Sterilfiltration.

Die fraktionierte Sterilisation gilt eigentlich als materialschonende Methode, zeigte jedoch einen stärkeren Einfluss auf die Abnahme des Molekulargewichts und der Viskosität. In der Aufnahme zur Bestimmung des Molekulargewichts kam es zu einer Verschiebung des Retentionsvolumens mit einer deutlichen Schulter nach links (Abb. 12). Diese Schulterstrukturen wiesen auf kleinere Aggregate hin, die sich im Chitosan bilden und nicht bei der Analyse vorgeschalteten Filtration ausgefiltert wurden. Ähnliche Veränderungen waren ebenfalls bei den autoklavierten Proben und am stärksten ausgeprägt bei den trocken sterilisierten Proben zu beobachten. Dies steht im Zusammenhang mit der Instabilität von Chitosanen gegenüber Hitzeeinwirkungen. Sobald gelöste Chitosane stark erhitzt werden (200 °C), unterliegt die Kettenstruktur einer Konformationsänderung. Die hydrierte Form (Abb. 4 A) wird irreversibel in eine wasserfreie „anhydrous“ Form überführt (Abb. 4 B), deren Einzelketten sich ähnlich dem Chitosan zu Faltblättern anordnen und damit eine starrere Struktur annehmen und eine Aggregatbildung fördern [Lim et al., 1999; Ogawa et al., 2004]. Diese Theorie wird auch durch die deutliche Abnahme des hydrodynamischen Radius bei den erhitzten Proben gestützt. Aggregatbildungen traten zudem auch in Abhängigkeit zur eingesetzten Chitosankonzentration und bei neutralem bis basischem pH-Wert auf, was bei den TEM-Aufnahmen von *E. coli* (Abb. 20) ebenfalls deutlich zu erkennen war [Schatz et al., 2003]. Je nach Grad der Aggregation wurden diese dann durch die Vorabfiltration aus der Analyse entfernt bzw. blieben auf der Analysensäule hängen, so dass das mittlere Molekulargewicht kleiner wurde. Aus den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich, dass die Sterilisationsbehandlungen keinen Einfluss auf den Acetylierungsgrad hatten. Allein bei der Sterilfiltration war der Acetylierungsgrad in geringem Umfang erhöht. Eine Wechselwirkung der Polyethersulfon-Membran mit den Aminogruppen ist jedoch nicht bekannt.

Fazit: Die Sterilfiltration hatte den geringsten Einfluss auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften Acetylierungsgrad, Molekulargewicht und Viskosität zu haben. Gängige thermalbasierte Sterilisationsmethoden eignen sich nur bedingt für die Sterilisation von Chitosanen und sollten nur angewendet werden, wenn eine anschließende Bestimmung der charakteristischen Parameter möglich ist.

4.1.3 Einfluss des Schwermetallgehalts der Chitosane

Für Chitosan A [0.08], B [0.02] und D [0.13] wurde der Schwermetallgehalt bestimmt, um eine Beeinträchtigung durch Metallvergiftung ausschließen zu können (Tab. 8). Klassische Anzeichen für Metallvergiftungen waren in den prokaryotischen Testsystemen nicht zu

erkennen. Besonders Kupfer gehört zu den Metallen, die besonders bekannt sind, sich negativ auf die Entwicklung von Bakterien auszuwirken [Yoon et al., 2007]. Der Gesamtgehalt an Schwermetallen war in Chitosan B [0.02] am niedrigsten und in Chitosan D [0.13] am höchsten, ebenso war der Kupfergehalt in Chitosan B [0.02] am geringsten und in Chitosan A [0.08] am höchsten. Wie jedoch aus Tab. 15 (Abschnitt 3.3.6) deutlich wurde, wirkte sich überwiegend Chitosan B [0.02] in geringeren Konzentrationen negativer auf die Entwicklung der Bakterien aus, als die Chitosane A [0.08] und D [0.13]. Ein Zusammenhang zwischen dem Effekt eines Chitosans auf Bakterien und dem Schwermetallgehalt des Chitosans konnte daher nicht nachgewiesen werden. Dies ist evtl. auch darauf zurückzuführen, dass die ermittelten Gehalte an Schwermetallen alle unterhalb der Grenz- und Richtwerte der Trinkwasserverordnung 2001, beziehungsweise unterhalb der Richtwerte der WHO 2004 oder der Berufsgenossenschaft 2011 lagen [BG BAU, 2011; TrinkwV, 1990, 2001; World Health Organisation, 2004].

Fazit: Der Schwermetallgehalt in allen untersuchten Chitosanen befand sich unterhalb der allgemeinen Grenz- und Richtwerte. Es konnte gezeigt werden, dass der Effekt von Chitosanen auf Bakterien nicht mit dem jeweiligen Metallgehalt des Chitosans korreliert, so dass der Einfluss durch Metallvergiftungen ausgeschlossen werden kann.

4.2 Antimikrobielle Eigenschaften von Chitosanen bei Oberflächenbewuchs

Eine antimikrobielle Oberflächenbehandlung durch Chitosane hatte in den Untersuchungen keine effektive Wirkung. Erst sehr hohe Konzentrationen zeigten einen antibakteriellen Effekt und vergleichbare Konzentrationen keinen fungiziden Effekt. Ausschließlich geringe Unterschiede in der Auswirkung der Chitosane bei den Schimmelpilzuntersuchungen waren zu erkennen. Bei den bakteriellen Tests war zudem ein gleichmäßiges Auftragen von Chitosan D [0.13] auf Agaroseplatten nicht durchführbar, da das Chitosan nicht in die Agarose einzog, sondern nur auf der Oberfläche verschmiert werden konnte (seifige, filmartige Konsistenz). Beim anschließenden Auftragen der Bakterien wurden diese in den Film eingearbeitet (Daten nicht gezeigt). Es war somit davon auszugehen, dass die Bakterien möglicherweise im Film eingeschlossen waren und keinen Zugang zu den überlebenswichtigen Ressourcen, wie Nährstoffe und Sauerstoff, hatten. Ausgehend von der Theorie lag bei geringeren Chitosankonzentrationen keine starke Filmbildung vor, so dass

dann die Bakterien nicht eingeschlossen wurden und auf der Agaroseoberfläche unbeeinträchtigt wachsen konnten. Strukturelle Untersuchungen der Oberfläche und der Chitosanfilme konnten nicht durchgeführt werden, um die Möglichkeit einer Filmbildung und die damit einhergehende Auswirkung auf das Wachstumsverhalten der Bakterien durch potentiellen Sauerstoffabschluss auszuschließen. Daher waren die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen nicht zwingend auf den Effekt des Chitosans oder auf bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften der Chitosane zurückführbar. Potentiell wäre die Konzentration dann nur dahingehend entscheidend, ob es zu einem vollständigen Einschluss der Bakterien in einen Chitosanfilm kommt, beziehungsweise ob eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet wäre.

Eine Veränderung der Testdurchführung mittels Aufbringen kleiner chitosangetränkter Filter auf eine bakterienbehandelte Oberfläche (Agardiffusionstests) schien ebenfalls nicht zielführend. Ein derartig langes Kettenmolekül wie Chitosan wird nach dem Auftragen auf eine Agaroseplatte wahrscheinlich nur unzureichend in den Agar diffundieren. Gleichzeitig setzen sich Chitosane aus Polymeren unterschiedlicher Kettenlängen zusammen, so dass diese Ketten auch verschiedene Wandergeschwindigkeiten im Agar aufweisen können. Die Methode des Agardiffusionstests kann somit zu nicht kalkulierbaren Effekten führen bzw. ist es fraglich, ob eine Wirkung der Chitosane durch diese Methode nachzuweisen ist. Weitere Agardiffusionstests wurden daher nicht durchgeführt.

Fazit: Die klassischen Verfahren zur Untersuchung einer antibakteriellen Wirkung einer Substanz durch Oberflächenbehandlung konnten auf das Chitosan nicht erfolgreich angewendet werden. Chitosan selbst ist ein großes Polymer, das im Agardiffusionstest mit der Matrix (Agarose) wechselwirken kann und daher keine verwendbaren Daten liefert.

4.2.1 Effekte auf Schimmelpilze

Die untersuchten Pilze *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens*, *Paecilomyces variotii* und *Penicillium funiculosum* sind Vertreter der Askomyceten und gehören zu der systematisch heterogenen Gruppe der Schimmelpilze. Sie besiedeln Nahrungsmittel sowie andere organische Materialien. In den Untersuchungen waren die Glucoseagarplatten mit dem Chitosan D [0.13] und dem Chitosan X [0.44] (Tab. 9 und Abb. 13) am stärksten mit Schimmelpilzen bewachsen. Dabei hatten die Schimmelpilze den chitosanbehandelten Objektträger nicht vom Rand (Nährmedium ohne Chitosan)

überwachsen, sondern die Sporenkeimung und die Ausbreitung des Pilzmycels fanden auch auf der chitosanbehandelten Oberfläche statt. Der Intensitätsunterschied in dem Ausmaß des Bewuchses auf dem Glucoseagar im Vergleich zu dem Bewuchs auf dem Objektträger war nicht zwingend auf eine fungistatische Wirkung des Chitosans zurückzuführen. Vielmehr bietet der Glucoseagar dem Myzel geeignetere Wachstums- und Nährstoffbedingungen. Ein Glasobjektträger ist schwerer zu bewachsen als Agarose und die Feuchtigkeit, die auf der Glasoberfläche verbleibt, bietet keine vergleichbare Versorgung mit Feuchtigkeit [Block, 1953]. Die in der Literatur propagierten fungiziden Eigenschaften der Chitosane [Kingkaew et al., 2014; Rabea et al., 2003; Seyfarth et al., 2008] konnten somit im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen für diesen Verbund der Schimmelpilze nicht bestätigt werden. Noch offenkundiger wurde das Fehlen einer eindeutigen Hemmung der Sporenkeimung durch Chitosane anhand der Ergebnisse auf dem Mineralagar (Tab. 9 und Abb. 13). Den Pilzen stand mit Ausnahme des Chitosans auf der Objektträgeroberfläche keine weitere Kohlenstoff-Quelle zur Verfügung. Das Wachstum ausschließlich auf dem Objektträger legt die Interpretation nahe, dass die Chitosane für die Pilze als Nährstoffquellen, respektive als Kohlenstoffquelle, genutzt werden können. Ein Einfluss auf das Wachstum durch das Molekulargewicht, den Acetylierungsgrad oder durch einen anderen physikalisch-chemischen Parameter der Chitosane konnte dabei nicht identifiziert werden. Laut Li und Mitarbeitern wirken Chitosane mit einer geringeren Kettenlänge fungistatischer als Chitosane höherer Kettenlänge [Li et al., 2008b]. Bei Betrachtung des Chitosan D [0.13] mit einer mittleren Kettenlänge (148.69 kg/mol) im Vergleich zum kurzkettigen Chitosan Y [0.10] (40.88 kg/mol) wäre diese Theorie möglich, doch Chitosan X [0.44] hat mit 43.06 kg/mol ein vergleichbares Molekulargewicht wie Chitosan Y [0.10], erzielte jedoch nicht die gleiche Wirkung. Die Wirkung von Chitosan X [0.44] war nicht stärker als die von Chitosan D [0.13].

Die höheren Pilze (Mycobionta) besitzen überwiegend Zellwände aus Chitin statt Zellulose, weswegen sie auch als Chitinpilze bezeichnet werden [Kadereit, 2002]. Die etwas höhere Effektivität kürzerer Chitosanketten in Bezug auf die Vermeidung eines pilzlichen Bewuchses beruht laut Li und Mitarbeitern darauf, dass diese kürzeren Ketten besser die Zellmembran der Pilze passieren [Li et al., 2008b]. Die langen Ketten können die gelartige Matrix der pilzlichen Zellwand vermutlich nicht durchdringen, da der Diffusionswiderstand zu hoch ist, während die kürzeren Ketten leichter in die Matrix eintauchen. Der fibrilläre Komplex der Zellwand besteht sowohl aus Chitin, als auch aus Chitosan, die über Gluconsäuren verknüpft sind (Abb. 6) [Gooday, 1994]. Nach dem Passieren der Membran treten laut

Li und Mitarbeitern 2008 diese kürzeren Ketten in Interaktion mit der DNA oder RNA und beeinträchtigen den Metabolismus, was die fungistatische Wirkung hervorruft [Li et al., 2008b]. Der Vorgang des „Passierens“ der Membran wird jedoch nicht genauer ausgeführt und die Realisierung bleibt fraglich. Die pilzliche Zellwand besteht überwiegend aus niedermolekularen Chitosanen mit kurzen Kettenlängen, weshalb eben von jenen Ketten keine Wirkung ausgehen sollte [Ondruschka et al., 2008]. Ebenso scheint das Passieren der Membran nur schwer vorstellbar, da daran angeschlossen zusätzlich noch die Plasmamembran überwunden werden muss.

Wie die Experimente auf dem Mineralagar zeigten, konnten Chitosane als Nährstoffquelle genutzt werden. Hierzu bedarf es spezieller Enzyme, den Chitosanasen. Nachweislich besitzen *Aspergillus*-Arten Chitosanasen, die durch enzymatische Hydrolyse langkettige Chitosane in Oligosaccharide spalten und diese als Kohlenstoffquelle nutzen können. Chitosane mit einem niedrigen Acetylierungsgrad eignen sich dabei besser als Substrat als Chitosane mit einem hohen Acetylierungsgrad [Cheng & Li, 2000]. Diese scheint jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen auf dem Mineralagar zu stehen. Die Pilze, die auf den Platten mit Chitosan X [0.44] zu erkennen sind, entsprechen dem typischen Erscheinungsbild von *Aspergillus niger*. Auf den mit Chitosan D [0.13] behandelten Objektträgern scheint sich eher *Paecilomyces variotii* auszubreiten. Demnach würde *Aspergillus niger* besser auf Chitosanen mit einem hohen Acetylierungsgrad (in diesem Fall Chitosan X [0.44]) wachsen als mit einem niedrigen Acetylierungsgrad (Chitosan D [0.13]). Allerdings ist die morphologische Ausprägung von Pilzen abhängig vom Substrat auf dem der Pilz wächst. So ist eine eindeutige Zuordnung der Arten, die sich auf den unterschiedlichen Chitosanen angesiedelt haben nicht auf Basis der rein physiologischen Merkmale möglich [Samson et al., 2007]. Schlussfolgernd lassen die unterschiedlichen Färbungen der bewachsenen Platten vermuten, dass abhängig vom Chitosan ein anderer Pilz aus der gemischten Sporensuspension das Spektrum dominiert. Die Korrelationsanalyse hat ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den charakteristischen Parametern der Chitosane und den Ergebnissen der Sporenkeimung herstellen können. Durch das Auftreten einer leichten fungistatischen Wirkung, hervorgerufen durch Chitosan Y [0.10], konnte jedoch gezeigt werden, dass theoretisch einige Chitosane stärker als andere wirken. In weiteren Forschungen müsste jedoch noch genauer untersucht werden, welche Parameterkombinationen entscheidend für eine fungizide Wirkung sind, welches der zugrundeliegende Mechanismus ist und auf welche Pilzarten sich diese Wirkung beschränken lässt. Von einer generellen fungistatischen oder fungiziden Wirkung kann zumindest nicht gesprochen werden, da auch

andere Autoren eine solche Wirkung nicht nachweisen konnten [Rhoades & Roller, 2000]. Bestätigen lässt sich lediglich, dass Chitosane allgemein nur auf bestimmte Pilze und nicht auf eine Bandbreite an Pilzen Einfluss nehmen und eine Chitosanbehandlung wahrscheinlich nur eine Verschiebung der Dominanzen bewirkt aber nicht den Bewuchs durch Schimmelpilzen verhindert [Robles-Martínez et al., 2014].

Fazit: Der Nachweis einer fungiziden oder fungistatischen Wirkung konnte nicht erbracht werden. Vermutlich besitzt Chitosan nur dann eine Wirksamkeit gegenüber Pilzen, wenn die getestete Art über keine Chitosanasen verfügt oder Chitosan in hohen Konzentrationen eingesetzt wird. Da Chitosane nicht auf alle Arten gleich wirken, würde die Repression einer Art die Keimung und Sporulation einer anderen Art nur begünstigen. Ein ökonomischer Nutzen von Chitosanen als Fungistatikum (allgemein gegen Schimmelpilze) ist daher vermutlich nicht gegeben.

4.2.2 Effekte auf *Escherichia coli*

Als Feststoffbestandteil in Agaroseplatten zeigte sich Chitosan nur in hohen Konzentrationen wirksam. Bei den Inhibitionstests ergaben ausschließlich sehr hohe Konzentrationen von 10 g/L Chitosan eine vollständige Inhibition des Bewuchses (MIC = 10 g/L) (Abschnitt 3.2.2). Diese Ergebnisse legen nahe, dass ausschließlich hohe Chitosankonzentrationen zur Oberflächenbehandlung geeignet sind, um die Oberfläche vor dem Bewuchs mit Bakterien zu schützen. Allerdings ist Chitosan ein sehr großes Kettenmolekül, bei dem nicht die gleichen Maßstäbe angesetzt werden können, wie in Agardiffusionstests (Antibiotika) üblich [Huys et al., 2002]. Chitosane sind heterogene Polymer-Gemische bestehend aus mehreren unterschiedlich beschaffenen Kettenmolekülen. Diese Ketten können in ihren Längen variieren und reichen von einigen gekoppelten Monomeren bis zu mehreren Tausend Einheiten, die ein Molekulargewicht von bis zu 1.000 kg/mol erreichen können [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007]. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt das Potential, durch die Agarosematrix zu diffundieren, ab. Die Spannweite des Wirkungsgrades dieser Chitosane ist somit deutlich eingeschränkt. Der über diese Methode detektierte Effekt ist somit verzerrt und bedarf höherer Mengen an Chitosan, um den Anteil an diffusionsfähigen Ketten zu erhöhen [Campos et al., 2006]. Bezogen auf die vorliegenden Ergebnisse bedeutet dies, dass ein direkter Kontakt des Chitosans mit dem Bakterium bestehen muss. Als weiteres Problem kommt die Eigenschaft der Agarose, antibakteriell wirkende Gruppen zu inaktivieren, hinzu [Chung & Chen, 2008]. Die Wahrscheinlichkeit eines direkten Kontakts, bzw. freier funktioneller Gruppen, erhöht sich

mit steigender Chitosankonzentration. Zudem ist wahrscheinlich, dass es durch die vorangegangene Autoklavierung der Agarose-Chitosanlösung zu keiner gleichmäßigen Verteilung der unterschiedlichen Chitosanketten über die Platte kam. Mit abnehmender Konzentration entstehen so „Chitosanlücken“ in der Agarosematrix, die ein Wachstum der Bakterien ermöglichen. Durch die Autoklavierung werden die Quervernetzungen der Kettenmoleküle noch erhöht [Lim et al., 1999], wodurch sie eine größere zusammenhängende Struktur bilden und die Entstehung von Aggregaten begünstigt (vergleichbar mit der α und β -Form des Chitins – Abschnitt 1.1) wird. Der Anteil der diffusionsfähigen Kettenmoleküle wird dabei weiter herabgesetzt (Abschnitt 4.1.2). Hierdurch entstehen auch um die einzelnen „Chitosanspots“ keine nachweisbaren Hemmhöfe. Erst in der sehr hohen Konzentration von 10 g/L Chitosan D [0.13] entstand ein ausreichend dichtes Netz aus Chitosanketten, was den Bakterien im direkten Kontakt keine Wachstumsmöglichkeiten in „Lücken“ ließ. Zusätzlich bewegte sich der pH-Wert der Agaroseplatten im neutralen Bereich, wodurch die Bioverfügbarkeit deutlich herabgesetzt wurde und nur verminderte antimikrobielle Effekte nachweisbar waren [Li et al., 2008a].

Dass Chitosane, an Feststoff gebunden oder in einer festen Matrix verankert, eine fungizide/fungistatische oder bakterizide/bakteriostatische Wirkung haben, kann dennoch nicht widerlegt werden. Vielmehr hat sich diese Art der Untersuchung zum Nachweis eines solchen Effektes aufgrund der Kettenstrukturen und Aggregatbildung für Chitosane als ungeeignet erwiesen. Auch andere Untersuchungen an Oberflächen, in denen Chitosan auf eine Trägersubstanz aufgebracht und die Bakterienzellen darauf verstrichen wurden, waren aufgrund der seifigen Struktur des Chitosans problematisch. Dass dies allerdings ein rein *E. coli*-spezifischer Effekt war, kann nicht ausgeschlossen werden. Neuere Ergebnisse zeigen, dass *E. coli* auf Chitosanfilmen nicht im Wachstum gehemmt wird, andere Bakterien, wie *S. aureus* (grampositiv) werden hingegen reprimiert [Kingkaew et al., 2014].

Fazit: Bei der Untersuchung der antibakteriellen Wirkung von Chitosanen ist die Verteilung der Chitosane in der Matrix und der damit verbundene direkte Kontakt mit den Bakterien entscheidend für die Wirkung. Die Methoden der Untersuchung einer antibakteriellen Wirkung auf einen oberflächlichen Bewuchs durch Bakterien bergen selbst zu viele nicht kontrollier- und nachvollziehbare Nebeneffekte. So ist ohne eine begleitende Untersuchung der Verteilung, der Faltung, des Diffusionsverhaltens der Chitosane in Agarose sowie die genaue Aufklärung der Interaktion der Agarose mit den Chitosanen ein Rückschluss auf den Effekt oder auf das Ausbleiben eines Effektes nur schwer möglich. Daher wurde auf diese Untersuchungsmethode im Weiteren verzichtet.

4.3 Antibakterielle Wirkung gelöster Chitosane

4.3.1 Wirkung auf gramnegative Bakterien

4.3.1.1 Einfluss des Chitosans auf das Wachstum von *Escherichia coli*

E. coli wurde als Stellvertreter der gramnegativen Bakterien gewählt und ist ein Darmbewohner, der in Symbiose mit Säugetieren lebt [Winfield & Groisman, 2003]. Gleichzeitig sind viele Stämme auch pathogen, verursachen Wundkrankheiten [Campos et al., 2006] und werden über die Nahrung aufgenommen und verbreitet [Wang, 1992]. Bei den Untersuchungen zu den Wachstumsbeeinträchtigungen durch Chitosan war die deutliche Ausprägung der Hormese und der enge Wirkungsbereich auffällig (Abb. 14 bis Abb. 18). Besonders das Monomer Glucosamin und das kurzkettige Polymer Chitosan Y [0.10] zeigten eine deutliche Hormese. Bei den Chitosanen wirkten Konzentrationen bis 10 mg/L stark wachstumsfördernd (Abb. 15). 30 mg/L bewirkten durchschnittlich eine mittlere Hemmung von 50 % und bei 100 mg/L trat eine komplette Inhibition ein. Im Vergleich zur breiten Spanne des wachstumsfördernden Bereichs, der bis zu zwei Dekaden überspannen kann, ist der hemmende Bereich mit 10-100 mg/L eng begrenzt. Bei der Wahl einer zu geringen Dosierung, kann daher durch den stark hormetischen Effekt eine kontraproduktive Wirkung eintreten und die vermeintliche Wachstumshemmung in eine Wachstumsförderung umschlagen. Ähnliches wurde auch von Liu und Mitarbeitern 2006 beobachtet, der berichtete, dass bei geringen Konzentrationen (< 20 mg/L) der wachstumsanregende Effekt des Chitosans überwiegt. Erst hohe Konzentrationen von 200 mg/L zeigten eine gute antimikrobielle Aktivität gegenüber *E. coli*. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass Chitosan die Bakterien abtötet und beides gemeinsam als Aggregat ausfällt [Liu et al., 2006].

Differenzierung der bakteriziden und bakteriostatischen Wirkung

Generell sollte allerdings zwischen bakterizider und bakteriostatischer Wirkung unterschieden werden. Eine durch Chitosan hervorgerufene antimikrobielle Wirkung konnte bei Konzentrationen um 1 g/L nachgewiesen werden. Jedoch lag hierbei keine bakterizide, sondern vielmehr eine bakteriostatische Wirkung vor (siehe Abschnitt Bakteriostase bei Aggregation der Bakterien und Chitosan und Abschnitt 4.3.3). Dies wurde durch die Ausdehnung der Untersuchungen von 24 Stunden auf 72 Stunden deutlich, wo eine Regeneration in Form von wieder einsetzendem Wachstum auftrat. Bei Chitosan A [0.08], B [0.02], D [0.13] und Y [0.10] war in den einzelnen Versuchsdurchläufen zu erkennen, dass Konzentrationen, die nach 24 Stunden eine 100 %ige Wachstumshemmung hervorriefen,

nach 72 Stunden keine 100 %ige Wachstumshemmung bewirkten. Besonders deutlich wurde dies in den Verschiebungen der EC_{90} -Werte bei Chitosan A [0.08] und Chitosan Y [0.10] (siehe Abb. 16). Beide Chitosane weisen einen Acetylierungsgrad um 0.1 (F_A) auf (Korrelationen mit Acetylierungsgrad siehe unten). Schon früher gab es Anhaltspunkte dafür, dass die vom Chitosan hervorgerufenen Effekte bei gramnegativen Bakterien reversibel sein könnten. Untersuchungen an *P. fragi* and *S. enteritidis* PT4 haben gezeigt, dass keine verstärkte Lyse eintritt, nachdem Chitosan wieder entfernt wurde [Helander et al., 2001]. Dies deutet darauf hin, dass hohe Chitosankonzentrationen zwar das Wachstum der Bakterien bis zur Stagnation beeinflussen können, allerdings nicht zum Tod der Bakterien führen.

Bakteriostase bei Aggregation der Bakterien und Chitosan

Chitosan, das auch bekanntermaßen als Komplexbilder eingesetzt wird, interagiert mit der Zellwand und bewirkt dadurch vermutlich eine Verlangsamung oder ein vorübergehendes Einstellen des Zellwachstums [Jin & Bai, 2002; Pan et al., 2011; Rabea et al., 2003]. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass chitosanbehandelte Bakterien „zusammenklumpen“. Bei vorangeschrittener Zeit (nach 24 h) wurden in den höchsten Konzentrationen (400 mg/L) teilweise Verklumpungen auch makroskopisch sichtbar. Dieser Zusammenschluss bewirkt, dass nur die Bakterien der äußeren Bereiche mit Chitosan in Kontakt kommen, Chitosan aber nicht in die inneren Bereiche vordringt. Bei einer lebend/tot-Färbung (detektiert im Laser-Scanning-Mikroskop) zeigten sich Bakterien, die sich zu einem Haufen zusammengefunden hatten und ein Aggregat bildeten. In diesem Aggregat waren die äußeren Bakterien abgestorben, aber die weiter innen liegenden Bakterien lebten (Daten nicht gezeigt). Wo innerhalb des Aggregats sich das Chitosan ablagerte, konnte nicht detektiert werden. Das Chitosan, falls es im Kern der Verklumpungen vorhanden war, aggregierte vermutlich ebenfalls und war somit nicht mehr reaktiv. Es ist somit möglich, dass Bakterienzellen im Inneren eines Bakterien- oder Bakterien/Chitosan-Aggregats vom Chitosan unberührt bleiben und von dort aus Keimzellen für neue Kolonien bilden. Dieses Verhalten einer Bakterienkolonie ist bekannt als eine Form der Apoptose bei Bakterien, in denen Teile einer Bakterienkolonie als Reaktion auf externen Stress absterben [Erental et al., 2012]. Andere Forscher nehmen dies als Beweis dafür, dass Mikroorganismen in der Lage sind, Chitosane abzubauen [Uchida et al., 1989]. Strand und Mitarbeiter zeigten, dass Chitosane zusammen mit *E. coli* ein gemeinsames Ausflocken bewirken [Strand et al., 2003]. Es ist wahrscheinlich, dass ein Einschließen von Chitosanaggregaten durch Bakterien kein Absterben der Bakterien zur Folge hat, sondern in Form von einer gezielten Apoptose

eingeleitet wurde. Durch die Aggregation und das Einschließen der Chitosane kommt es zu einem Herabsetzen der Gesamtkonzentration der Chitosane in der Lösung, was das Chitosan in seiner Wirkung abschwächt. Sobald die Konzentration durch diese Chelatbildung ausreichend herabgesetzt ist, kann das Wachstum wieder aufgenommen werden und die Neugründung von Kolonien stattfinden, obwohl die Ausgangskonzentration vormals zu einer 100 % Wachstumshemmung führte [Liu et al., 2006]. Gänzlich geklärt ist dieser Mechanismus bislang nicht. Es steht jedoch fest, dass es möglich ist, die antimikrobielle Wirkung durch Aggregation herabzusetzen. Auch durch die Zugaben von Fe^{2+} -Ionen und Zn^{2+} -Ionen konnte die antimikrobielle Wirkung herabgesetzt werden, da entweder wichtige Bindungsstellen besetzt wurden oder sich insgesamt die wirksame Oberfläche verringerte [Raafat et al., 2008].

Molekulargewicht

Die Theorien über den Einfluss des Molekulargewichts auf die antimikrobielle Wirkung gehen auseinander. No und Mitarbeiter vertreten die Meinung, dass Chitosane mit einem niedrigeren Molekulargewicht effektiver das Wachstum hemmen als Chitosane mit einem höheren Molekulargewicht [No et al., 2002]. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann dies mit Einschränkungen bestätigt werden, obwohl Chitosane mit einem hohen Molekulargewicht, vergleichbar zu Liu und Mitarbeitern (siehe vorherigen Absatz), nicht untersucht wurden [Liu et al., 2006]. Chitosan B [0.02] ist von den drei getesteten Chitosanen A [0.08], B [0.02], und D [0.13] das kurzketzigere Chitosan und wirkte am stärksten hemmend (Abb. 14 und Tab. 10). Chitosan X [0.44] und Y [0.10] verfügen jedoch über ein wesentlich geringeres Molekulargewicht. Chitosan Y [0.10] war allerdings weniger wirksam als Chitosan B [0.02] und Chitosan X [0.44] zeigte keine antimikrobielle Wirkung (Abschnitt 3.3.1). Statistisch konnte keine Korrelationen der antimikrobiellen Wirkung mit dem Molekulargewicht nachgewiesen werden. Beim Testen der Chitosane X [0.44] und Y [0.10], die ein vergleichbares Molekulargewicht aufwiesen, zeigte sich, dass Chitosan X [0.44] keinerlei negativen Einfluss auf das Bakterienwachstum hatte. Chitosan Y [0.10] hingegen wies bei vergleichbaren Konzentrationen eine deutlich antimikrobielle Wirkung auf. Aufgrund dessen wird in diesem Test das Molekulargewicht als bedeutsamer Einflussfaktor ausgeschlossen.

Acetylierungsgrad

In der Korrelation nach Pearson konnte zwar keine Korrelation mit dem Molekulargewicht, jedoch eine Korrelation mit dem Acetylierungsgrad ($p = 0.016$) und dem Muster der Acetylierung ($p = 0.043$) nachgewiesen werden (Abschnitt 3.3.1). Diese Werte waren allerdings nur zum Niveau $\alpha = 5\%$ signifikant. Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen waren keine Signifikanzen mehr festzustellen. Dies gibt jedoch zumindest den Hinweis darauf, dass die Anzahl der Acetylgruppen eine wichtige Rolle bei der antibakteriellen Wirkung der Chitosane zu spielen scheint. Chitosan B [0.02] mit dem niedrigsten Acetylierungsgrad von 0.02 rief (gemessen an dem EC_{50} -Wert) die stärkste Hemmung hervor, wohingegen Chitosan X [0.44] mit dem höchsten Acetylierungsgrad von 0.44 keine Hemmung verursachte. Im direkten Vergleich der beiden kurzkettigen Chitosane X [0.44] und Y [0.10] wurde dies ebenfalls deutlich. Chitosan Y [0.10] verfügt mit einem F_A von 0.1 über einen deutlich niedrigeren Acetylierungsgrad als Chitosan X [0.44] und zeigte bereits ab Konzentrationen von 16 mg/L erste hemmende Effekte. Chitosan X [0.44] hingegen beeinträchtigte selbst in hohen Konzentrationen das Wachstum der Bakterien nicht. Ähnliches ließ sich anhand der Tests der Monomere erkennen. Zum Erreichen des EC_{50} -Wertes wurden höhere Konzentrationen von N-Acetylglucosamin als von Glucosamin benötigt (Abb. 18). In Studien mit einer vergleichbaren Chitosanbehandlung wurden ähnliche Effekte festgestellt. Mellegård und Mitarbeiter testeten wasserlösliche Chitosan-Hydrochloridsalze unterschiedlichen Molekulargewichts und Acetylierungsgrades auf ihre antibakterielle Aktivität gegenüber u.a. *E. coli*. Chitosan mit einem F_A von 0.16 war dabei effektiver als Chitosan mit einem F_A von 0.48 [Mellegård et al., 2011]. Der zugrundeliegende Effekt ist nach wie vor strittig. Bei einem geringeren Acetylierungsgrad kann von einer verbesserten Löslichkeit ausgegangen werden, doch bei Betrachtung der Anzahl der deacetylierten Einheiten ($DP \cdot (1 - F_A)$) fällt auf, dass Chitosan B [0.02] die geringste Anzahl aufweist und somit die Löslichkeit in Verbindung mit dem Molekül gegenüber den anderen Chitosanen herabgesetzt sein müsste. Dieser Effekt wird allerdings zusätzlich durch das Muster der Acetylierung beeinflusst. Chitosan B [0.02] mit einer Tendenz zur blockweisen Anordnung der Substituenten verhindert das Wachstum der Bakterien am effektivsten. Inwieweit jedoch die Löslichkeit durch das Substitutionsmuster beeinträchtigt ist, konnte nicht untersucht werden. Auch ließen sich keine ähnlichen Beobachtungen in der Literatur finden, da dieser physikalisch-chemische Parameter P_A bisher nicht standardmäßig untersucht wurde.

pH-Wert

Bei Betrachtung der pH-Werte fiel auf, dass in den höchsten getesteten Konzentrationen ausschließlich bei den Monomeren die pH-Werte auf 4.5 bis 5.5 absanken (trotz Puffer). Ein Bakterienwachstum in diesen Konzentrationen wurde daher bereits durch den pH-Wert gehemmt. Normalerweise liegt das pH-Optimum für das Wachstum von *E. coli* im neutralen Bereich, doch gilt *E. coli* als säuretolerant und überlebt auch in Umgebungen mit einem pH-Wert von 2 [Foster, 2004]. Allerdings gehen die Bakterien in die stationäre Phase über, in der Kulturen wesentlich stress- und säuretoleranter sind als in exponentieller Wachstumsphase [Lindqvist & Barmark, 2014]. Unter Anwesenheit von Essigsäure ist daher kein Wachstum bei pH-Werten von 4 bis 4.5 nachweisbar. Ab einem pH-Wert von 5 findet beeinträchtigtes Wachstum statt, normales Wachstum aber erst ab einem pH-Wert von 5.5 [Conner & Kotrola, 1995]. Alle übrigen gemessenen pH-Werte schwankten in einem Bereich von 6.1 bis 6.6. Carpenter und seine Mitarbeiter haben nachgewiesen, dass Essigsäure im Allgemeinen einen bakteriostatischen Einfluss haben kann, auch wenn der pH-Wert auf ein normales Niveau ansteigt [Carpenter et al., 2011]. Die gemessene Essigsäurekonzentration in 1 g/L Chitosan Y [0.10] betrug bei der maximal eingesetzten Chitosankonzentration 2.6 mM (Tab. 6). In den Kontrollen konnte jedoch gezeigt werden, dass bis zu einer Konzentration von 10 mM Natriumacetat das Wachstum der Bakterien nicht negativ beeinträchtigt wurde (Abb. 18). Eine Beeinträchtigung des Wachstums durch den pH-Wert oder die Essigsäurekonzentration anstelle des Chitosans kann daher ausgeschlossen werden. Auch in der statistischen Auswertung fand sich keine Korrelation mit dem pH-Wert oder der Essigsäurekonzentration.

Chloridgehalt

Die Chitosane A [0.08], B [0.02] und D [0.13] lagen als Chitosanchloride vor und waren damit den gänzlich unbehandelten Chitosanen gegenüber besser wasserlöslich. Um eine Beeinträchtigung des Wachstums durch Chloridionen auszuschließen, wurde Natriumchlorid als Kontrolle getestet. Der Chloridgehalt zeigte eine Beeinträchtigung in den Kontrollen mit Natriumchlorid ab einer Konzentration von ca. 15 g/L (Abb. 18). Den höchsten Chloridgehalt wies allgemein Chitosan B [0.02] auf (Tab. 6). Doch auch beim Einsatz von 40 mg/L Chitosan überschritt der Chloridgehalt mit ca. 180 mM nicht die minimal wirksame Konzentration. Modelluntersuchungen von Hosein und Mitarbeitern zur antimikrobiellen

Wirkung unterschiedlicher Salzgehalte in Kombination mit Essigsäure prognostizieren ebenfalls keinen negativen Einfluss auf das Bakterienwachstum unter den hier zugrunde liegenden Bedingungen [Hosein et al., 2011].

Die Zusammenhänge der Chitosanwirkung mit den physikalisch-chemischen Einflussgrößen sind komplexer als zu Beginn angenommen. Mehrere Faktoren sind bei der Wirkkette zu berücksichtigen. Aufgrund dessen wurde zusätzlich versucht, die Wirkung von Chitosan auf die Stoffwechselaktivität näher zu beleuchten (siehe folgenden Abschnitt).

Fazit: Eine proliferierende Bakterienkultur kann durch Chitosankonzentrationen von 10-50 mg/L inhibiert werden. Allerdings wirkt Chitosan nicht bakterizid. Bei geringen Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass Chitosan lediglich eine Bakteriostase auslöst. Im Zusammenhang mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften waren am ehesten Korrelationen mit dem Acetylierungsgrad und dem Muster der Acetylierung zu erkennen. Das Molekulargewicht, der pH-Wert und die Chloridgehalte zeigten keinen Einfluss auf die Wirkung der Chitosane.

4.3.1.2 Einfluss des Chitosans auf die Atmung von *Escherichia coli*

Die NADH-Dehydrogenase ist Teil der mitochondrialen Atmungskette und sorgt für den Erhalt des Protonengradienten [Friedrich & Scheide, 2000]. In Anwesenheit von $\text{NADH} + \text{H}^+$ sorgt das Enzym für die Reduktion des blauen Farbstoffs Resazurin in den pinken Farbstoff Resorufin. Ist das Wachstum der Bakterienkultur unterbrochen oder tritt die Bakteriostase ein, kommt die Atmungskette zum Erliegen und der Farbstoff bleibt blau [Brouwer, 1991]. Neuere Untersuchungen isolierter NADH-Dehydrogenasen haben ergeben, dass niedrige Konzentrationen von Chitosan die Atmung anregen, jedoch höhere Konzentrationen zur kompletten Inhibition der Atmung führen können [Robles-Martínez et al., 2014]. Ob Chitosan dabei die Synthese der Dehydrogenase durch Inhibition des codierenden Gens *ndh* reguliert, ist bislang unklar. Allerdings gibt es Anhaltspunkte dafür, dass Bakterien, durch Chitosan beeinflusst, in eine anaerobe Atmung übergehen [Raafat et al., 2008]. Unter diesen Voraussetzungen liegt eine Beeinflussung durch Chitosan vor, die allerdings nicht zum Absterben der Kolonien führen muss.

Einfluss der physikalisch-chemischen Eigenschaften

Die vorliegenden Ergebnisse aus den Dehydrogenasetests bestätigen den deutlichen Einfluss des Chitosans auf die Atmungskette der untersuchten Bakterien. Die Ergebnisse aus der Dehydrogenaseaktivität zeigten allerdings, dass unterschiedliche physikalisch-chemische

Eigenschaften und daher auch unterschiedliche Chitosane die Atmungskette und die Proliferation (Abb. 16 bis Abb. 18 und Abb. 22 bis Abb. 24) beeinflussen. Der Konzentrationsbereich der Inhibition der Dehydrogenaseaktivität entsprach zwar dem wirksamen Konzentrationsbereich, der das Wachstum im Proliferationsassay beeinträchtigte, doch im Vergleich der Chitosane sind keine vergleichbaren Muster im Zusammenhang mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften aufgetreten (Tab. 10 und Tab. 11).

Die Art der Berechnung der Kurve für die Dehydrogenaseaktivität bei *E. coli* erzeugte breitere Konfidenzintervalle. Bei ausschließlicher Berücksichtigung der EC-Werte war jedoch zu erkennen, dass die vormals (im Proliferationsassay) deutliche Effektivität von Chitosan B [0.02] gegenüber den übrigen Chitosanen durch dieses Testverfahren nicht nachgewiesen werden konnte. Die EC₅₀-Werte im Dehydrogenasetest mit *E. coli* lagen alle zwischen 18 und 22 mg/L, so dass diese von den Konfidenzintervallen der übrigen Chitosane mit eingeschlossen wurden. Dessen ungeachtet ergab sich eine sinkende Effektivität von Chitosan D [0.13] über Chitosan A [0.08] und B [0.02] nach Chitosan Y [0.10]. Von einem deutlichen Unterschied in der Wirkung war nur bei Chitosan Y [0.10] zu sprechen. Der Wirkungsbereich reichte von 17 bis 42 mg/L mit einem EC₅₀-Wert bei 27 mg/L. Damit zeigte Chitosan Y [0.10] einen deutlich geringeren Einfluss auf die Stoffwechselaktivität als die übrigen Chitosane. Die Gründe hierfür konnten jedoch nicht näher geklärt werden, da die Korrelationen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften keine weiteren Anhaltspunkte lieferten. Die unterschiedlichen Teilbereiche, Wachstum und Atmung, werden anscheinend durch verschiedene physikalisch-chemischen Eigenschaften beeinträchtigt. Dies ließe sich jedoch nur durch gezielte Chitosan-Fractionen mit eindeutig definierten Eigenschaften genau feststellen, bei denen beispielsweise kein mittleres Molekulargewicht sondern ein definiertes Molekulargewicht vorläge. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, langkettige Chitosane mit derartigen Eigenschaften herzustellen.

Eine Korrelationen zum (mittleren) Molekulargewicht und dem Acetylierungsgrad (nach Löslichkeitsbehandlung) konnte nicht identifiziert werden. Es ergab sich jedoch eine positive Korrelation der EC₅₀-Werte zum Polymerisationsgrad (Pearson: $p = 0.002$; PCA: $p = 0.012$) ebenso eine Korrelation mit dem Proteingehalt, die jedoch nach Anwendung von Bonferroni zum multiplen Niveau α nicht signifikant waren. In der Literatur wurde solch ein Zusammenhang bisher ebenfalls nicht signifikant nachgewiesen. Alleinige große Sprünge von Monomeren zu Oligomeren und zu Polymeren wurden untersucht. Dabei stellte sich heraus,

dass der Acetylierungsgrad vermutlich eine bedeutendere Rolle spielt als die Kettenlänge [Fujiwara et al., 2004]. Statistisch betrachtet ist es jedoch möglich, dass eine signifikante Beteiligung der physikalisch-chemischen Eigenschaften durch die starke Streuung der Ergebnisse überlagert wurde.

pH-Einfluss

Der verwendete Dehydrogenasetest basierte auf dem “*solid-contact test with Arthrobacter globiformis*“, veröffentlicht und überarbeitet von Neumann-Hensel und Melbye [2006] [Neumann-Hensel & Melbye, 2006]. Der Test ist in Bezug auf seine vorgesehene Anwendung zur Untersuchung von Böden nicht unstrittig. Als problematisch wird der Verbleib der zu untersuchenden Bodenprobe während der spektroskopischen Auswertung betrachtet [Ahlf, 2007]. Durch die Verwendung von Flüssigkeit statt eines Feststoffes ist diese Testform unterdessen in unterschiedlichen Varianten standardmäßig zur Untersuchung von Bakterien im Einsatz [Mariscal et al., 2009]. Allerdings muss unterhalb des neutralen Bereichs ein konstanter pH-Wert eingehalten werden, da sich Fluoreszenz-Quantenausbeute von Resazurin und Resorufin in Abhängigkeit zum pH-Wert verschlechtert [Montejano et al., 2005]. Trotz Einsatzes des MES Puffers kam es zu leichten pH-Wert Schwankungen in den hohen Konzentrationen, die besonders bei den Glucosaminexperimenten zu stärkeren Varianzen in den Ergebnissen führten. Obwohl die Tests exakte Ergebnisse lieferten, erschweren die größeren Varianzen den Vergleich der Tests miteinander. Die pH-Wert Empfindlichkeit dieses Tests ist literaturbekannt [Ahlf, 2007].

Fazit: Es wurde signifikant nachgewiesen, dass mit steigendem Polymerisationsgrad die Atmungskette von *E. coli* stärker inhibiert wird. Es wurden keine weiteren signifikanten Korrelationen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften identifiziert. Für eine genauere Differenzierung der anderen physikalisch-chemischen Eigenschaften und deren Rolle in der Regulation der Atmungskette von *E. coli*, müssten synthetische Chitosane hergestellt und eingesetzt werden.

4.3.1.3 Einfluss des Chitosans auf die Membranstruktur von *Escherichia coli* (TEM)

In einigen Fällen wurde das Wachstum der Bakterien innerhalb der ersten Stunden durch Chitosan unterdrückt, setzte jedoch später wieder ein (siehe Chitosan X [0.44] in Abschnitt 3.3.1). Die Wachstumsraten erreichten in diesen Fällen nach 24 Stunden vergleichbare Werte, ähnlich den unbehandelten Proben. Chitosan X [0.44] erzeugte maximal eine Stase von

E. coli. Für Chitosan D [0.13] hingegen konnte eine deutlichere Wachstumsinhibition nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Dehydrogenase der Atmung von *E. coli* durch Chitosane beeinflusst wurde. In beiden Fällen bleibt zu klären, in welchem Zustand sich die Bakterien während der Chitosanbehandlung befanden, d.h. ob die Bakterien in Stase fielen oder das Wachstum durch Absterben unterbrochen wurde und in wie weit dabei die Membran der Bakterien und damit auch die Atmungskette in Mitleidenschaft gezogen wurden. Dieses konnte anteilig mittels elektronenmikroskopischer Betrachtung geklärt werden. Unter Einfluss des Chitosans D [0.13] im zeitlichen Verlauf (Abb. 19 und Abb. 21) ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender Inkubationszeit die Deformationen der Zellen zunahmten. Zu Beginn waren ausschließlich an der äußeren Membran vesikuläre Strukturen zu erkennen, die ihrerseits aus der äußeren Membran bestehen (erkennbare Lipiddoppelschicht - siehe Abb. 19, vgl. Abb. 7). Diese Strukturen entstehen in direkter Folge aus der Interaktion des Polykations Chitosan mit der überwiegend anionischen Oberfläche der Bakterienzellen (Lipopolysaccharide) [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007]. Ob die vesikulären Strukturen Bestandteil eines Abwehrmechanismus sind, mit dem die Bakterienzelle versucht, das Chitosan über „Einkapseln“ unschädlich zu machen, oder ob somit „beschädigte“ Zellwand aus der Matrix entfernt werden soll, ist unklar. Dass in Folge der Interaktion mit Chitosanen Lipide aus dem Membranverband herausgelöst werden, konnte jedoch bislang nicht nachgewiesen werden [Raafat et al., 2008]. Durch eine einfache Zerstörung der äußeren Membran würden mit hoher Wahrscheinlichkeit Zerfallsprodukte im Medium erkennbar sein, was Helander und Mitarbeiter durch die Zugabe von EDTA simuliert haben. Im Fall einer Behandlung mit Chitosan konnten jedoch keine Zerfallsprodukte nachgewiesen werden. Dieser Umstand würde daher für einen zelleigenen Abwehrmechanismus sprechen, der in einem „Aufweichen“ der Membran resultiert [Helander et al., 2001]. Auch in den vorliegenden Untersuchungen war neben den vesikulären Strukturen auch ein leichtes Aufquellen der Zellwand zu erkennen (Abb. 19). Dieses würde die Theorie von Helander und Mitarbeitern bestätigen. Allerdings sind auch Fixierungsartefakte nicht auszuschließen, die ein Anschwellen der Zellwand hervorrufen könnten. Diese Artefakte müssten dann wiederum in den Kontrollen ebenfalls zu finden sein. Zu dem zugrunde liegenden Mechanismus konnte in Mutationsexperimenten gezeigt werden, dass eine kationische Oberfläche nicht vergleichbar stark von Chitosanen penetriert werden konnte [Helander et al., 2001]. Es scheint daher bestätigt, dass eine Bindung des Chitosan an die negativ geladenen Bestandteile der Membran aber zusätzlich auch eine strukturelle Änderung der Membran stattfindet, was den strukturellen Zusammenhalt der äußeren

Membran verändert [Je & Kim, 2006]. Die äußere Membran fungiert als Barriere und stabilisiert die Zelle [Nikaido, 1996]. Die Poren der äußeren Membran besitzen eine Größe von 0.6 nm [Nikaido & Rosenberg, 1981] und die der Mureinschicht einen Durchmesser von 2.06 nm [Vollmer et al., 2008]. Chitosan D [0.13] verfügt über einen hydrodynamischen Radius von annähernd 19 nm und ist damit als Makromolekül deutlich zu groß, um die äußere Membran bzw. die Mureinschicht zu passieren. In den TEM-Aufnahmen war zu erkennen, dass die Zytoplasmamembran vorerst intakt blieb. Dennoch waren mit Voranschreiten der Einwirkung des Chitosans die Zellen von Bereichen ohne scheinbaren Inhalt dominiert. Es kam vermutlich zu einem Auslaufen des Zellinhaltes, was nur geschehen konnte, wenn auch die Zytoplasmamembran Defekte aufwies. Je weiter die Deformation voranschritt, desto stärker löste sich die äußere Membran in Vesikel auf, einhergehend mit einer Vergrößerung des periplasmatischen Spalts (Abb. 19 D-II). Es blieben nur noch Zellfragmente zurück. Das Ablösen der äußeren von der inneren Membran muss dabei nicht auf die Denaturierung der Bindungsproteine des periplasmatischen Spalts zurück gehen, da es nicht konstant bei allen Zellen auftrat. In der seriellen Aufnahme (Abb. 21) waren die Membranen nur in den seltensten Fällen voneinander abgelöst. Es traten allerdings die genannten schwammartigen Verformungen auf, bei denen sich der periplasmatische Spalt vergrößerte und die äußere Membran wellig auflag (Abb. 21 D-I). Da dieses in den Kontrollen nicht auftrat, sind diese Verformungen direkt auf die Einwirkung des Chitosans zurückzuführen. Der pH-Wert der Versuche zur seriellen Aufnahme war gegenüber dem zeitlichen Verlauf (Abb. 19) erhöht. In den seriellen Untersuchungen zu Abb. 21 lag der pH-Wert anfangs bei 6.0 statt 5.5. Scheinbar lagerte sich unter diesen Bedingungen vermehrt „elektronendichtes“ Material (basierend auf dem TEM Signal) in dem periplasmatischen Spalt ab. Ob das Anschwellen dabei tatsächlich einem Anschwellen des Spaltes oder dem Anschwellen des Zytoplasmas entspricht, müsste durch weitere Messungen untersucht werden.

In den seriellen TEM-Aufnahmen (Abb. 20) sind zusätzlich deutlich wiederkehrende Strukturen, vermutlich Chitosanaggregate, zu erkennen, die mit steigender Chitosankonzentration zunehmen. Es könnte sich um Fixierungsartefakte handeln, doch wie aus den Proliferationsexperimenten hervorging, stieg der pH-Wert im Laufe des Versuches. In den TEM-Untersuchungen wurde zudem auf eine vorherige Lösung des Chitosans in Essigsäure verzichtet. Es ist daher davon auszugehen, dass bei einem Start-pH von 6.0 im Verlauf des Experiments der pK_s-Wert von 6.3 überschritten wurde. Durch den veränderten pH-Wert erfährt die Kettenstruktur eine Konformationsänderung. Die Hydroxylgruppen an den Kohlenstoffatomen C-6 und C-3 verbinden sich über intra- und intermolekulare

Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminogruppen, bzw. den Acetylgruppen, zu linearen Aggregaten [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007]. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei den im TEM sichtbaren Strukturen (neben den Bakterien) um Chitosanaggregate handelte. Die entstandenen linearen Aggregate fanden sich zu größeren Aggregatstrukturen zusammen, die überraschend große Dimensionen annahmen. In ihrer Ausdehnung umfassten diese Aggregate ein bis mehrere Mikrometer (Abb. 20). Unter diesem Gesichtspunkt ist das Passieren der bakteriellen Membran eines derart großen Polymers endgültig auszuschließen. Doch selbst unter der Annahme, dass Oligomere oder Monomere in der Lage wären, die äußere Membran zu passieren und nur dieser Teil des Chitosangemisches eine tatsächliche Wirkung verursachen würde, müssten dann die Oligomere, wie Chitosan X [0.44] und Y [0.10] sowie die Monomere Glucosamin oder N-Acetylglucosamin, eine stärkere Wirkung in den Proliferationsassays erzielen als die langkettigeren Chitosane A [0.08], B [0.02] und D [0.13]. Dieses konnte jedoch in den Proliferationsassays widerlegt werden. Es muss daher ein kaskadisch verlaufender Prozess in Betracht gezogen werden, bei dem erst die äußere Membran penetriert und danach die Zytoplasmamembran von langkettigeren Chitosanen angegriffen wird [Chung & Chen, 2008]. Sobald die Zytoplasmamembran ebenfalls kleine Defekte aufweist, ist es kurzkettigeren Molekülen möglich, die Membran zu passieren. Besonders die Chitosane geringen Molekulargewichts und Nanopartikel, könnten nach Passieren der Membran, an die DNA binden und dadurch Syntheseprozesse innerhalb der Bakterienzelle beeinträchtigen [Kong et al., 2010; Sudarshan et al., 1992]. Mit zunehmendem Verlust der Syntheseprodukte zerfallen die „inneren“ Organisationsstrukturen der Zelle, was die Stabilität soweit beeinträchtigt, dass die Zellen „erschaffen“ und ihre natürliche Stäbchenform verlieren. Desweiteren wäre es denkbar, dass diese Chitosanformen in den Wachstumsprozess eingreifen und als „falschpositive“ Strukturen in die Mureinschicht eingebaut werden, da diese über ähnliche Strukturen im Aufbau verfügt. Gleichzeitig müsste eine Verdickung der Mureinschicht auch elektronenmikroskopisch sichtbar werden. Partiiell waren zwar dunklere Bereiche unterhalb der äußeren Membran zu identifizieren, doch eine genaue Zuordnung zur Mureinschicht war nicht möglich. Dieses unterstützt die Theorie einer kombinierten Wirkung lang- und kurzkettiger Chitosane, die im natürlichen Chitosan immer als Gemisch vorkommen. Ob die Aggregate im Verbund mit den Bakterienzellen auftreten, kann an dieser Stelle nicht näher verifiziert werden. Mögliche Aggregat-Bakterien-Verbünde sind durch die mechanische Beanspruchung bei der Probenerstellung zur TEM-Untersuchung vermutlich zerstört worden.

Einige Autoren vermuten hinter der Chitosanbehandlung einen reversiblen Vorgang [Helander et al., 2001]. Nach mikroskopischer Untersuchung der exponierten Bakterien lässt sich dies nur unter der Annahme bestätigen, dass die Kultur als Ganzes betrachtet wird und nicht der Effekt auf die einzelne Zelle damit beschrieben wird. Innerhalb weniger Minuten traten bereits bei den vereinzelt Zellen erste Strukturveränderungen der Membranen auf, die mikroskopisch nachweisbar waren [Raafat et al., 2008]. Sobald eine Konzentration an Chitosan erreicht ist, die einen Abwehrprozess auslöst, nehmen die Bakterienzellen Schaden. Bei niedrigen Chitosankonzentrationen mag der Effekt durch das Entfernen des Chitosans noch reversibel sein, da die penetrierten Bakterienzellen die „befallenen“ Bereiche möglicherweise per Vesikel abstoßen und danach in eine normale Teilung übergehen. Doch sobald höhere Konzentrationen eingesetzt wurden, waren nach bereits 30 Minuten bei einer Chitosankonzentration von 1 g/L die entstandenen Schäden an den Membranen zu groß, um umkehrbar zu sein (Abb. 19 und Abb. 20). Nach 3 Stunden waren keine Zellen ohne Schäden mehr zu erkennen, so dass eine Reaktivierung der Kultur unwahrscheinlich wäre (Abb. 19 und Abb. 20). Es ist daher nur bei leichter Exposition mit geringer Chitosankonzentration möglich, dass einzelne Zellen die Exposition überleben und eine neue Kolonie begründen. Einen ähnlichen Effekt auf die Zellen zeigt auch eine erhöhte Salzkonzentration. Bei Inkubation mit bis zu 10 % NaCl, welches dem Medium zugegeben wird, sind nach 24 Stunden Schrumpfungen festzustellen. Die Zellwand löst sich vom Zytoplasma und es entstehen Zellverformungen. Allerdings sind keine „Blebs“ dokumentiert worden und die Zellwand ist weniger angegriffen, so dass der festgestellte Effekt nicht dem eingetragenen Salz sondern vielmehr der Wirkung des Chitosans zuzuordnen ist [Hajmeer et al., 2006]. Auch zeigten die Ergebnisse aus den Dehydrogenase-Experimenten und dem Proliferationsassay, dass Natriumchlorid alleine in der Menge, die durch Chitosan eingetragen wird, keinen vergleichbaren Effekt auf das Wachstum oder Dehydrogenaseaktivität zeigt, wie die Chitosane (Abb. 15 und Abb. 24).

Eine Beschädigung der äußeren Membran bei *E. coli* bedeutet nicht gleichzeitig die Zerstörung der Atmungskette durch Eliminierung der NADH-Dehydrogenasen. Jedoch wird es den Chitosanen ermöglicht in Kontakt mit der inneren Membran zu gelangen, wo sich die membrangebundenen NADH-Dehydrogenasen befinden [Kracke et al., 2015]. Es kommt zur Inhibition der Atmung [Robles-Martínez et al., 2014]. Doch inwieweit die Chitosane mit den NADH-Dehydrogenasen interagieren bleibt noch zu klären.

Die reversible Wirkung des Chitosans und damit auch das Wiedereinsetzen des Wachstums in den Proliferationsassays könnte auf Aggregate zurückzuführen sein in denen die

zentral liegenden Zellen geschützt vorliegen, welche anschließend eine neue Kulturen begründen. Dieses konnte in den TEM-Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden, da ausschließlich „frei“ Zellen der Zellsuspension und keine möglichen Zellverbände des Bodensatzes untersucht wurden.

Fazit: Mit steigender Konzentration und Dauer der Chitosaneinwirkung kommt es zu starken strukturellen Veränderungen besonders der äußeren Membran, was letztendlich zum Absterben der bakteriellen Einzelzellen führt. Für die Einzelzelle stellt dies einen irreversiblen Schaden dar. Besonders die Atmung der Bakterien wird beeinträchtigt. Eine Bakterienkultur kann aber in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationszeit vermutlich im Zellverbund dennoch reaktiviert werden, da einzelne Bakterien in einem Aggregat durch andere Bakterien vor dem Chitosan abgeschirmt werden könnten.

4.3.1.4 Beeinträchtigung des Leuchtverhaltens von *Vibrio fischeri*

V. fischeri gehört zu den marinen, symbiotisch lebenden Bakterien. Es handelt sich um ein gramnegatives Bakterium, welches zu natürlicher Biolumineszenz befähigt ist [Boettcher & Ruby, 1990]. Bislang wurde die Beeinträchtigung der Leuchtleistung durch Chitosane nicht untersucht. Allerdings ist Chitin ein Bestandteil des natürlichen Lebensraums der *V. fischeri* Bakterien. *V. fischeri* sowie Arten aus *V. fischeri* verwandten Gattungen (z.B. *Vibrio alginolyticus*) bevorzugen Chitin als Nahrungsgrundlage [Krupesha Sharma et al., 2011]. Sie sind zum Abbau von Chitinen durch Chitinasen befähigt und verfügen über eine erhöhte Salztoleranz [Park et al., 2000]. In Abhängigkeit zur steigenden Chitosan-Konzentration kam es zu einer Verminderung der Leuchtleistung (Abb. 28 und Tab. 14).

Acetylierungsgrad

Wie die Reihenfolge der steigenden Wirksamkeit der Chitosane zeigt (Chitosan B [0.02] gefolgt von Chitosan A [0.08], Chitosan D [0.13], Chitosan Y [0.10] und Chitosan X [0.44]), bedurfte es mit steigendem Acetylierungsgrad einer höheren Konzentration des jeweiligen Chitosans, um einen 50 % Effekt hervorzurufen (Abb. 28 und Tab. 14). Mittels der Pearson-Korrelation konnte nachgewiesen werden, dass der EC_{50} - und der EC_{90} -Wert mit dem Acetylierungsgrad korrelierten ($p = 0.002/0.005$) (nicht signifikant nach der Bonferroni-Korrektur). Somit steht die Abnahme der Leuchtleistung um 50 % (EC_{50} -Werte) in engem Zusammenhang mit dem Acetylierungsgrad des jeweiligen Chitosans. In Untersuchungen mit *Vibrio cholerae*, vorgenommen durch Trai et al. (2002), konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die antimikrobielle Wirkung umso stärker ausfällt, je geringer der Acetylierungsgrad ist

[Tsai et al., 2002]. Dieser Zusammenhang lässt sich darauf zurückführen, dass die Effektivität der Chitosane mit der Anzahl an freien Aminogruppen an der C-2 Position zusammenhängt. Die hydrophoben Eigenschaften ermöglichen ein Wechselwirken mit den hydrophoben Komponenten der bakteriellen Zellwand [Je & Kim, 2006]. Der Acetylierungsgrad ist somit maßgeblich für die antibakterielle Wirkung verantwortlich.

Beim Vergleich der vorliegenden Ergebnisse der Chitosane mit den Monomeren ist zu bemerken, dass der EC_{50} -Wert des N-Acetylglucosamin (vergleichbar mit hohem Acetylierungsgrad) bei 4 g/L lag, wohingegen der des Glucosamins (vergleichbar mit niedrigem Acetylierungsgrad) erst bei einer Konzentration von 19 g/L eine 50 % Inhibition verursachte. Dies ist gegenläufig zu den Beobachtungen bei den Chitosanen, die eine steigende Inhibierung mit fallendem Acetylierungsgrad aufwiesen. Obwohl das Wirkverhalten der Monomere nicht im Detail geklärt werden konnte, zeigte sich dieser geringere oder gegenläufige Effekt in allen Studien. Daher ist das Wirkverhalten der Monomere generell als nicht vergleichbar mit den Chitosanen einzustufen.

Molekulargewicht

Für das Molekulargewicht konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der *E. coli* Proliferationstests aus Abschnitt 4.3.1.1. In Untersuchungen von No und Mitarbeitern (2002) zeigte sich, dass Chitosanoligomere einen deutlich geringeren Effekt auf das Wachstum von *Vibrio parahaemolyticus* ausübten, als langkettigere Chitosane [No et al., 2002]. Allerdings verhielt sich die Auswirkung des Molekulargewichts auf die antibakterielle Wirkung im Allgemeinen nicht monoton. Am wirksamsten erwiesen sich laut No und Mitarbeitern Chitosane mit einem Molekulargewicht von 470 und 746 kg/mol und sowohl niedrigere und höhere Molekulargewichte zeigten einen schwächer werdenden Effekt [No et al., 2002]. In den vorliegenden Untersuchungen wurden Chitosane mit Molekulargewichten bis maximal 157 kg/mol untersucht (Tab. 6), so dass im Vergleich mit den von No und Mitarbeitern untersuchten Chitosanen die vorliegenden Chitosane alle ein niedriges Molekulargewicht aufwiesen. Es ist daher anzunehmen, dass der nicht signifikante Effekt bei den untersuchten (und im Vergleich niedrigen) Molekulargewichten einen unteren Wirkschwellenwert erreicht hat, so dass erst wieder bei höheren Molekulargewichten eine signifikante Wechselwirkung auftritt. Bei Folgeversuchen wäre daher eine breitere Verteilung der Molekulargewichte über das gesamte Wirkspektrum zu empfehlen.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Monomeren wurde der Trend bestätigt, dass geringer Molekulargewichte geringer Effekte hervorriefen. Bei den Monomeren bedurfte es einer doppelten bis zehnfachen Dosierung im Vergleich zu dem kurzkettigen Chitosan Y [0.10], bis eine 50 % Inhibition der Leuchtleistung erreicht werden konnte.

pH-Wert

In den Untersuchungen konnte experimentell keine 100 % Inhibition der Leuchtleistung erzielt werden, wodurch ein direkter Vergleich mit der minimalen Hemmkonzentration (MIC) nicht möglich war. Die EC_{90} -Werte waren um nahezu ein Hundertfaches höher (Tab. 14) als die in der Literatur angegebenen Werte für z.B. *Vibrio cholerae* und *Vibrio parahaemolyticus* [Tsai et al., 2002]. Vergleichbare Untersuchungen mit *V. fischeri* konnten nicht gefunden werden. Dies könnte mit einem Effekt zusammen hängen, der bislang in Verbindung mit Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung kaum erwähnt wird. Bei den meisten Chitosanen konnte die Leuchtintensität aufgrund der steigenden Viskosität der Lösung nur bis zu einem Effekt von ca. 25 % untersucht werden. Bei Chitosan B [0.02] zeigte sich keine klassische Konzentrations-Wirkungskurve, die sich einem Effekt von 0 % annähert, sondern vielmehr approximieren die gemessenen Effekte eine Leuchtleistung von 25 %. Dies kann damit zusammenhängen, dass für diesen Testverlauf ein pH-Wert zwischen 6 und 8 vorliegen muss, damit die Leuchtleistung nicht durch den pH-Wert beeinträchtigt wird [Lange, 2011]. Höhere pH-Werte über pH 6.3 führen zu einem Anstieg der Präzipitation des Chitosans [Domard, 1987]. Die Chitosanlösung hat einen pH-Wert von ca. 4, der durch den Puffer weitestgehend abgefangen wird, so dass der Versuch überwiegend bei einem pH-Wert zwischen 6 und 6.8 stattfand. Chitosane besitzen im allgemeinen pK-Werte zwischen 6.45 und 6.9 in Abhängigkeit von ihrem Acetylierungsgrad [Sorlier et al., 2002]. Entspricht der pH-Wert dem pK-Wert wird das Gleichgewicht in Richtung der Präzipitation verschoben. Bei niedrigen Acetylierungsgraden, wie es bei Chitosan B [0.02] der Fall war, sinkt somit der pK-Wert. Die salzige Umgebung erhöht wiederum den pK-Wert [Sorlier et al., 2001]. Es besteht somit die Möglichkeit, dass das Chitosan B [0.02] in einem Bereich untersucht wurde, indem es bereits zunehmend unlöslich aufgrund des vorliegenden pH-Wertes war. Dies würde auch die starken Schwankungen der Einzelexperimente untereinander erklären.

Die Mizellbildung kann als zweiter Effekt für die Erklärung der Annäherung an einen Leuchtintensitätsschwellenwert herangezogen werden. Ab einer bestimmten Konzentration lagern sich die Chitosanketten zu Mizellen zusammen. Hierdurch wird ein Teil der Chitosane der Bioverfügbarkeit entzogen, so dass selbst bei steigender eingesetzter Konzentration der

Effekt nur noch leicht und nicht direkt gekoppelt zunimmt. Es ist bekannt, dass die Möglichkeit einer reversiblen Aggregatbildung mit steigender Konzentration zunimmt [Anthonsen et al., 1994]. Die kritische Aggregatkonzentration liegt bei 0,1 g/L und verhält sich unabhängig zur jeweiligen Ionenstärke [Qun & Ajun, 2006]. Da dieses Phänomen im vorliegenden Fall nicht bei allen Chitosanen gleichermaßen, sondern insbesondere bei Chitosan B [0.02] auftrat, scheint die kritische Aggregatkonzentration in Abhängigkeit zum Acetylierungsgrad oder Acetylierungsmuster zu stehen. Allerdings konnte diese These laut neuesten Erkenntnissen, nach denen die Aggregatbildung unabhängig vom Grad der Acetylierung ist, nicht für den Acetylierungsgrad bestätigt werden [Philippova et al., 2012]. Es ist daher möglich, dass alleinig das Acetylierungsmuster den ausschlaggebenden Effekt für die Mizellbildung hervorruft. Diese These müsste in weitergehenden Studien vertieft und bestätigt werden.

Chitosanasen

Ein weiterer Aspekt, der das breite Wirkspektrum von *V. fischeri* erklären könnte ist die vermutete „natürliche Resistenz“ gegenüber Chitosan. *V. fischeri* verfügt über Chitinasen [Fukasawa et al., 1992]. Der Unterschied zwischen Chitinasen und Chitosanasen ist sehr gering, da beide Enzyme dafür bekannt sind, Chitosane mit unterschiedlichen Acetylierungsgraden abzubauen [Hung et al., 2002]. Aufgrund des marinen Lebensraumes ist es daher wahrscheinlich, dass *V. fischeri* ebenfalls über chitosanspaltende Enzyme verfügt. Bisher gibt es keine Studien darüber, ob Chitosanasen in *V. fischeri* vorkommen. Je nach Komplementärstruktur und Acetylierungsgrad können hierbei Chitosanasen die Wirkeffektivität der Chitosane durch Degradierung der Polymere verändern. Somit ist es möglich, dass die Chitosanwirkung auch von *V. fischeri* selbst beeinträchtigt wurde. Die Spaltung von Chitosanasen wurde im Abschnitt 4.3.2.1 am Beispiel von *B. subtilis* näher beschrieben [Omumasaba et al., 2000].

Fazit: Durch die Salztoleranz des Bakteriums kann davon ausgegangen werden, dass der Chloridgehalt keinen Effekt erzielt. Dennoch kommt es zu einer chitosaninduzierten Wirkung. Das Wirkungsspektrum (EC₁₀ - EC₉₀) ist gegenüber den anderen Bakterien deutlich verbreitert, was am pH-Wert, an einer Mizellbildung im Zusammenhang mit dem zusätzlich im Medium vorhandenen Salz oder an potentiellen Chitosanasen von *V. fischeri* liegen kann. Unabhängig davon zeigt sich der Acetylierungsgrad in Kombination mit dem Substitutionsmuster als hauptsächlicher Einflussfaktor in der Wirkung der Chitosane auf *V. fischeri*.

4.3.2 Wirkung auf grampositive Bakterien

4.3.2.1 Beeinträchtigung der Atmungskette von *Bacillus subtilis*

Mit Ausnahme des Chitosan B [0.02], welches gemessen an den EC₅₀-Werten mit 17.85 mg/L bei *B. subtilis* die stärkste Wirkung ausübte, sank die Effektivität von Chitosan A [0.08], über Chitosan D [0.13] nach Chitosan Y [0.10]. Die Wirkung von Chitosan Y [0.10] war am schwächsten und bedurfte einer höheren Dosierung von 22 mg/L zum Erreichen des EC₅₀-Wertes (Tab. 12). Im Folgenden sind die Effekte auf die Atmung für die einzelnen physikalisch-chemischen Eigenschaften diskutiert.

Molekulargewicht und Polymerisationsgrad

Chitosan Y [0.10] verursachte mit dem niedrigsten Molekulargewicht den deutlich geringsten Effekt, während bei gleicher Dosierung die übrigen Chitosane nahezu gleich wirkten. Es konnte keine Korrelation mit dem mittleren Molekulargewicht nachgewiesen werden, was vergleichbare Ergebnisse von Gerasimenko und Mitarbeiter bestätigt haben. Bei der Untersuchung von LMW (Low-Molecular-Weight) Chitosanen unterschiedlichen Molekulargewichts war der Effekt auf *B. subtilis* über alle Chitosane nahezu konstant [Gerasimenko et al., 2004]. Entweder ist die Kettenlänge für den Wirkmechanismus unerheblich, oder die wirksame Kettenlänge liegt in derselben Konzentration vor. *B. subtilis* verfügt darüber hinaus über Chitosanasen, die längere Chitosanketten verkürzen können [Omumasaba et al., 2000]. Es wäre daher denkbar, dass alle Chitosanketten durch die Chitosanasen gespalten wurden. Würde dieser Abbauprozess weiter verfolgt werden, lägen fast identische Oligomere vor, die einen nahezu identischen Effekt hervorrufen könnten. Bei Untersuchungen von Jeon und Mitarbeitern zeigte sich ebenfalls, dass alle Oligomere unterschiedlicher Länge (1-10 kDa) auf *B. subtilis* nahezu den gleichen Effekt hatten [Jeon et al., 2001]. Die Chitosanasen von *B. subtilis* erkennen Kettenlängen ab 4 Einheiten und können größere Polymere innerhalb von 2-3 Stunden zur Hälfte in Oligomere (< 6 Einheiten) spalten [Omumasaba et al., 2000]. Chitosan Y [0.10] besitzt mit einem DP < 240 die geringste Kettenlänge und wird daher auch potentiell in kleinere Oligomere (Reste) gespalten. Der Anteil an abgespaltenen Monomeren/Oligomeren dürfte daher höher sein, als bei den übrigen Chitosanen. Die getesteten Monomere erzielten in vergleichbaren Konzentrationen eine deutlich geringere inhibierende Wirkung auf die Dehydrogenase als die Polymere. Glucosamin war dabei nahezu gänzlich wirkungslos gegenüber N-Acetylglucosamin. Die Einbeziehung des Acetylierungsgrades scheint daher sinnvoll, da Chitosanasen zugleich eine höhere Aktivität gegenüber einem geringen Acetylierungsgrad aufweisen

[Omumasaba et al., 2000]. Dies deckt sich mit den Korrelationsstudien, bei denen eine Korrelation des EC_{10} -Wertes ($p = 0.036$) und der Hauptkomponente der PCA ($p = 0.04$) zu den deacetylierten Einheiten ($DP \cdot [1 - F_A]$) festgestellt werden konnte. Daraus folgt, dass bei *B. subtilis* weniger die Interaktion der Chitosane mit der Zellwand, als die Kompatibilität der Chitosane (abhängig von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften) mit den beteiligten Chitosanasen eine Rolle spielt.

Chloridgehalt

Bei *B. subtilis* zeigte sich ein deutlicher Einfluss des durch die Chitosane eingetragenen Chloridgehalts auf die Hemmung der Dehydrogenase. Es ergab sich eine deutliche Korrelation mit den EC_{50} -Werten ($p < 0.003$). Es ist jedoch auszuschließen, dass tatsächlich der Salzgehalt direkt einen inhibierenden Effekt hervorrief, da in den Kontrollen *B. subtilis* erst bei Konzentrationen > 0.5 mol/L NaCl ein hemmender Effekt zu beobachten war. Der Eintrag durch die Chitosane war jedoch in jedem Fall < 0.4 mol/L. Interessanterweise zeigte sich der inhibitorische Effekt gemessen am EC_{50} -Wert umso stärker, je niedriger der Chloridgehalt war. Dies ist jedoch kein Fehler im durchgeführten Verfahren, da auch Tsai und Su zu ähnlichen Ergebnissen kamen [Tsai & Su, 1999]. Der Effekt ist vermutlich nicht durch einen direkten, sondern vielmehr durch einen indirekten Wirkmechanismus zu erklären. *B. subtilis* ist ein bodenbewohnendes Bakterium, das sich zumeist nicht im Wachstum befindet. Dies sichert dem Bakterium das Überleben in Zeiten, in denen es nicht idealen Wachstumsbedingungen im Boden ausgesetzt ist. Die Produktion genereller Stressproteine ist dabei eine der ersten Reaktionen auf sich verändernde Umweltbedingungen, wie Sauerstoffmangel [Völker et al., 1994]. Der Eintrag von Salz (hier indirekt gegeben durch Chitosane) induziert bei *B. subtilis* ebenfalls die Produktion allgemeiner Stressproteine [Hecker et al., 1988]. Je höher der Salzgehalt, desto eher werden möglicherweise Stressproteine synthetisiert. Diese Stressproteine wirken oxidativem Stress entgegen und schützen somit auch in Teilen vor den Auswirkungen des Chitosans auf *Staphylococcus aureus*. Ein hoher Eintrag von Salz (unterhalb einer schädigenden Grenze) würde somit die bakterieneigenen Abwehrsysteme stärken, was wiederum dem negativen Einfluss von Chitosan entgegenwirken würde. Ein durch Chitosan (nicht in Zusammenhang mit Chlorid) hervorgerufener Abwehrmechanismus in Form einer Produktion von Stressproteinen konnte zwar bisher nicht nachgewiesen werden [Raafat et al., 2008], doch schließt dies die Möglichkeit einer indirekten Induktion der Stressproteine durch mitgeführte Chloride nicht aus.

Acetatkonzentration

In den Substanzkontrollen reagierte *B. subtilis* trotz der hohen pH-Toleranz (5-8.6) sehr empfindlich auf steigende Acetatkonzentrationen [Breed et al., 1957]. Es ließen sich allerdings keine Korrelationen oder Anhaltspunkte finden, die belegen, dass der Eintrag von Essigsäure durch die Chitosane ein beeinträchtigender Faktor war. Nur in sehr hohen Chitosankonzentrationen wurde die kritische Acetatkonzentration erreicht. Gleichzeitig führt Chitosan Y [0.10], das den höchsten Acetat-Eintrag bewirkte, zu der geringsten Inhibition der Dehydrogenase, so dass nicht von einer Beeinflussung der Wirkungsweise durch Acetat ausgegangen werden muss.

Fazit: Die Dehydrogenaseaktivität von *B. subtilis* wurde vermutlich durch den Einfluss eigener Chitosanasen und durch die getesteten langkettigen Chitosane gleichermaßen beeinträchtigt. Die deutlichste Korrelation zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften ist zwischen den EC-Werten und der Anzahl deacetylierter Einheiten aufgetreten. Zusätzlich gibt es Hinweise auf den Einfluss von Stressproteinen, die den reziproken Einfluss des Chloridgehalts erklären könnten.

4.3.3 Zusammenfassende Betrachtung der Mikroorganismen

In ihrer Gesamtheit betrachtet, konnte für die untersuchten Chitosane eine überwiegend eher antibakterielle, denn eine fungizide Auswirkung aufgezeigt werden. Gleiche Rückschlüsse zogen auch Logesh und seine Mitarbeiter aus ihren Untersuchungen [Logesh et al., 2012]. Zudem scheinen *Aspergillus* Arten resistent gegenüber Chitosan zu sein, was durch Untersuchungen an *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus parasiticus* bestätigt wurde [Tsai et al., 2002]. Bei der Zuordnung physikalisch-chemischer Eigenschaften zum antimikrobiellen Verhalten ist zwischen Bakterien und Pilzen deutlich zu unterscheiden. Bei den Pilzen war einzig das Chitosan Y [0.10] mit einer geringen Kettenlänge und einem F_A von 0.1 das Chitosan, welches andeutungsweise eine Hemmung des Pilzwachstums hervorgerufen hat (Tab. 9). Bei den Bakterien hingegen bewirkte Chitosan Y [0.10] zumeist die geringste Inhibition (Tab. 15). Auch andere Studien konnten zeigen, dass Chitosane geringer Kettenlänge nur mäßig inhibierend auf Bakterien wirken, während sie mit abnehmender Kettenlänge eine steigend negative Wirkung auf das Wachstum von Pilzen ausüben [Jeon et al., 2001; Li et al., 2008b]. Die Zellwand der Zygomyceten besteht zu einem Teil aus Chitin und Chitosan (Abb. 6), so dass größeren Chitosanketten ein Passieren der Membran unmöglich ist [Gooday, 1994]. Größere Chitosanmoleküle neigen eher zu gefalteten Strukturen, als Chitosan kleinerer Kettenlänge, das mehr als starre Kette vorliegt

[Weinhold et al., 2009]. Daher ist Chitosanen geringerer Kettenlänge eher eine Passage der Membran möglich. Bei Bakterien wird durch den differenten Aufbau der Zellwand eine Diffusion ausgeschlossen. Vielmehr ist eine Interaktion der positiv geladenen Polymere mit der negativ geladenen Membran anzunehmen, so dass bei der Wirkungsweise der Chitosane vermutlich bei Zygomyceten und Bakterien ein anderer Mechanismus zugrunde liegt [Helander et al., 2001; Raafat et al., 2008].

Bei allen Bakterien konnte ein konzentrationsabhängiger, hemmender Effekt durch Zugabe der unterschiedlichen Chitosane erzielt werden. Bei den gramnegativen Bakterien zeigten steigende Einwirkzeiten einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation und einen zunehmend zerstörenden Effekt auf die morphologische Beschaffenheit der bakteriellen Zellwand, wie es auch Chung & Chen beschreiben [Chung & Chen, 2008]. Ebenso sind die Leuchtleistung von *V. fischeri* und die Dehydrogenase der Atmungskette von *E. coli* negativ durch Chitosan beeinträchtigt worden. *B. subtilis* wurde im Dehydrogenaseassay als Vertreter der grampositiven Bakterien gewählt, da im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass grampositive und gramnegative Bakterien durch ihre unterschiedliche Zellwandbeschaffenheit auf andere Weise von Chitosan beeinflusst werden. Allgemein herrscht Uneinigkeit darüber, ob grampositive oder gramnegative Bakterien stärker durch Chitosan beeinträchtigt werden. Zum einen existiert die Auffassung, dass gramnegative Bakterien deutlich stärker durch Chitosan inhibiert werden als grampositive und bei ihnen eine stärkere Schädigung der Zellmembran hervorgerufen wird [Chen et al., 2002; Chung & Chen, 2008]. Zum anderen wird von einer deutlich stärkeren Beeinträchtigung grampositiver Bakterien ausgegangen, was anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden konnte [Goy & Assis, 2014; No et al., 2002]. Im Dehydrogenaseassay waren die Reaktionen der grampositiven Bakterien denen der gramnegativen Bakterien (*E. coli*) sehr ähnlich (Tab. 15). Die mittleren effektiven Konzentrationen waren bei *B. subtilis* mit Werten zwischen 17.9 und 22.4 mg/L marginal geringer als bei *E. coli*. Bei *E. coli* war jedoch die Tendenz zu erkennen, dass sich mit steigender Kettenlänge der inhibierende Effekt erhöhte. Dies konnte bei Untersuchungen von Gerasimenko und seinen Mitarbeitern von unterschiedlichen LMW-Chitosanen ebenfalls nachgewiesen werden [Gerasimenko et al., 2004]. Dennoch ist anhand vorliegender Ergebnisse nicht von einer stärkeren Beeinträchtigung grampositiver Bakterien auszugehen. Selbst innerhalb der Gruppe der gramnegativen Bakterien unterschieden sich die Art und Weise der Wirkung deutlich voneinander, was an den uneinheitlichen EC-Werten zu erkennen war. So scheinen weniger die Aspekte der Zellwandmorphologie ausschlaggebend zu sein als vielmehr Additiva wie Säuren, Metalle und Salze, ebenso wie auch vermeintlich

untergeordnete Eigenschaften der Zellwandchemie (z.B. hydrophobe Eigenschaften) [Chen et al., 2002; Chung et al., 2004]]. Jeon und Mitarbeiter haben ebenfalls verschiedene Bakterienstämme getestet und es ist deutlich zu erkennen, dass es nicht ausschließlich einen Unterschied zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien gibt, sondern auch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Arten. Zwei Arten, das gramnegative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und das grampositive Bakterium *B. subtilis* treten dabei besonders hervor. Beide reagieren auf langkettiges Chitosan nicht mit einer Inhibition von 100 %. *Pseudomonas aeruginosa* wird sogar nur zu 68 % inhibiert. Bei weiteren Tests mit Chitosanen kürzerer Kettenlänge nimmt die Inhibition noch weiter ab und erreicht einen Tiefpunkt bei 22 %. Bei *B. subtilis* ruft das langkettige Chitosan eine Inhibition von 98 % hervor und die übrigen kurzkettigen Chitosane ein nahezu gleichmäßiges Niveau von 63 % [Jeon et al., 2001]. Bei der Betrachtung beider Arten fällt auf, dass nicht nur für *Bacillus sp.* sondern auch *Pseudomonas sp.* die Synthese von Chitosanen nachgewiesen werden konnte [Omumasaba et al., 2000; Wang et al., 2008]. Auch in anderen Untersuchungen konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien festgestellt werden [Logesh et al., 2012]. So muss die Betrachtung mehr auf Lebensumstände und spezifische Merkmale einer Art erweitert werden, wie eine fakultativ anaerobe Lebensweise, eine ausgeprägte Säure- und Salztoleranz und das Vorkommen von Chitosanen.

Bei der ausschließlichen Betrachtung der Bakterien lässt sich über die unterschiedlichen Tests kein signifikanter Zusammenhang zu einer physikalisch-chemischen Eigenschaft (Tab. 6) erkennen. Hauptsächlich entscheidend sind sowohl die Kettenlänge (DP) als auch der Acetylierungsgrad (F_A) sowie das Acetylierungsmuster (P_A). Kein Zusammenhang konnte hingegen mit dem Molekulargewicht festgestellt werden; anders als bei Kean & Thanou, bei denen bei einem niedrigen F_A die Toxizität mit dem Molekulargewicht korrelierte [Kean & Thanou, 2010]. Da Chitosan X [0.44] das einzige Chitosan mit einem $F_A > 0.15$ war, konnte diese These weder bestätigt noch widerlegt werden. Die Kettenlänge und der Acetylierungsgrad unterliegen jedoch einer zusätzlichen Einschränkung. So unterschied sich die Wirkung bei Monomeren oder Oligomeren, von denen langkettiger Chitosane. Bei den Monomeren rief nicht der niedrigste Acetylierungsgrad den größten Effekt hervor, sondern N-Acetylglucosamin (gleichzusetzen mit einem Acetylierungsgrad von 1) verursacht einen deutlich stärkeren Effekt bei allen Tests als Glucosamin (gleichzusetzen mit einem Acetylierungsgrad von 0). Dieses Ergebnis bedarf weiterer Untersuchungen, da üblicherweise

N-Acetylglucosamin als Bestandteil der bakteriellen Zellwand selbst als Angriffspunkt für antibakterielle Substanzen gilt [Warth & Strominger, 1971]. Schatz und seine Mitarbeiter sehen dabei den Acetylierungsgrad als verantwortlich, so dass ein Chitosan mit einem $F_A < 0.2$ (alle Chitosane mit Ausnahme von Chitosan X [0.44]) kaum gefaltet vorliegt und somit als Polykation wirksam werden kann [Schatz et al., 2003].

Denkbar ist eine Kaskade von Effekten, die im Resultat einen antibakteriellen Effekt erzielen. Dabei sind unterschiedliche Eigenschaften des Chitosans jeweils für einen anderen Effekt verantwortlich. Die positive Ladung der protonierten Aminogruppen der langkettigeren Chitosane ermöglicht eine Interaktion mit der Zellwand, wie es die kurzkettingen Oligomere nicht vermögen. Es ist denkbar, dass die Polymere eine Matrix um die jeweiligen Bakterien bilden, die eine sauerstoffarme Atmosphäre schafft, was Stressreaktionen bei den Bakterien auslöst [Raafat et al., 2008]. Die filmbildenden Eigenschaften von Chitosanen sind hinreichend bekannt und werden gerne eingesetzt. Nachweislich nimmt jedoch die Adhäsion von Zellen an Chitosanfilmen mit fallendem Acetylierungsgrad zu [Chatelet et al., 2001]. Dies würde gleichzeitig auch die geringere antibakterielle Wirkung auf oberflächlichen Bewuchs erklären. Die Ähnlichkeit des exprimierten Genmusters nach Kontakt mit Chitosan mit dem des Expressionsmusters bei durch unzureichende Sauerstoffzufuhr verursachtem Stress und die gleichzeitig nachgewiesene Beeinträchtigung der Atmungskette bereits nach kurzer Kontaktzeit (Abschnitt 3.3.3 und 3.3.4) stützen diese These [Raafat et al., 2008]. Auch scheinen anaerobe Bakterien weniger durch Chitosan inhibiert zu werden als aerobe Bakterien [Costa et al., 2012; Šimůnek et al., 2006]. Gleichzeitig verhindert die Chitosanbarriere um die Zellen die Aufnahme von Nährstoffen und die Chitosane treten in ihrer Eigenschaft als Polykation in Wechselwirkung mit negativ geladenen Komponenten der bakteriellen Zellwand [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007]. Diese Interaktion hat einen destabilisierenden Einfluss auf die Membran, wie durch Mutationsstudien nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.3.2). Bakterien mit hoch kationischer Oberfläche werden erheblich weniger durch Chitosan beeinträchtigt [Helander et al., 2001]. Eine Interaktion der positiv geladenen Moleküle mit der negativ geladenen Membran ist daher einer der Haupteinflussfaktoren. Die Membran verliert zunehmend an Stabilität, wobei sie weniger aufgelöst als aufgeweicht wird. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei Vergleichsstudien mit EDTA, wo die äußere Membran aufgelöst wurde, es allerdings zum Herauslösen von Lipiden kam. Chitosan zeigte keinen vergleichbaren Effekt. Die Membran wird zwar aufgeweicht, aber keine Lipide durch Chitosan herausgelöst

[Helander et al., 2001; Raafat et al., 2008]. Des Weiteren kommt es zu Veränderungen der Membran und Bildung vesikulärer Strukturen durch veränderte Umweltbedingungen [Frohlich et al., 2014]. Die Gründe sind bisher ungeklärt. Die Bildung von vesikulären Strukturen an der äußeren Membran von *E. coli* könnte eine Reaktion auf den Mangel eines terminalen Elektronenakzeptors (oxidativer Stress) sein. Dabei könnten die vesikulären Strukturen zur Vergrößerung der Oberfläche und damit der „Matrix“ der Atmungskette dienen. Eine Beeinflussung der Atmungskette wurde durch die Dehydrogenasetests nachgewiesen. Durch eine veränderte respiratorische Tätigkeit sind lokale pH-Änderungen an der Membran möglich, die das Autolysin *AtlA* aktivieren, was wiederum die Autolyse der Zelle anregt [Biswas et al., 2012]. Durch Einwirken von Autolysinen kommt es zu weiteren Zellwandschädigungen, die zur vollständigen Lyse respektive zum Tod der Zelle führen. So würde Chitosan indirekt eine Apoptose der Bakterienzellen bewirken. Die Morphologie chitosanbehandelter Zellen und komplett lysierter Zellen ist sehr ähnlich [Pathak & Chauhan, 2011; Wang et al., 2012], bzw. gleicht der Effekt dem des ebenfalls kationischen AMPs, der gleichermaßen an der Membran der Bakterien wirkt und dort die Anordnung der Lipide ändert [Wang et al., 2012]. Diese Theorien sind jedoch bislang unbestätigt. Ob es sich bei den vesikulären Strukturen um kürzlich exprimierte Proteine der Atmungskette, um Abfallprodukte einer eingeleiteten Autolyse oder um bereits passagiertes Chitosan handelt, bleibt weiter zu untersuchen. Fest steht, dass infolge der Chitosanbehandlung die Zytoplasmamembran in ihrer Funktion als Barriere zusammenbricht [Je & Kim, 2006]. Die Prozesse sind dabei reversibel, so lange es nicht zur Zerstörung der Membranstruktur kommt. Nach dem Zusammenbrechen der Membranbarriere kommt es zur Bindung der Chitosane an RNA und zur Verhinderung der DNA Synthese, wodurch die Schädigung irreversibel wird [Harish Prashanth & Tharanathan, 2007].

Einen nicht zu vernachlässigenden Aspekt stellt der Chloridgehalt dar. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass mit steigendem Chloridgehalt die Wirkung des Chitosans abnimmt [Tsai & Su, 1999]. Entweder wird mit steigendem Chloridgehalt die Bioverfügbarkeit erhöht oder die Produktion von Stressproteinen wird angeregt [Hecker et al., 1988]. Ob der Anstieg der Stressproteine eine Abwehrreaktion bewirkt, die in die Wirkungskette des Chitosans eingreift, bleibt weiter zu untersuchen. Bei *V. fischeri* kann jedoch auch eine leichte Form des Aussalzens der Polymere vorliegen, wodurch die filmbildenden Eigenschaften eingeschränkt würden. Das Medium ist ebenfalls salzhaltiger. Zwar waren keine makroskopisch sichtbaren und vor der Zugabe der Bakterien auch keine mikroskopisch sichtbaren Präzipitate zu

erkennen, aber zusammen mit den Bakterien können Komplexe entstanden sein, die später nicht mehr als ausgefällte Polymere zu identifizieren wären. Andere Chloride oder Metallionen, wie Magnesiumchlorid, bewirken ebenfalls einen verminderten Effekt des Chitosans. Dies würde die enorme Spannbreite der Wirkung des Chitosans erklären, die sich bei *V. fischeri* über mehr als sechs Zehnerpotenzen erstreckte [Chung et al., 2003; Helander et al., 2001].

Ein weiterer bislang nicht beschriebener Aspekt ist die Wechselwirkung von Chitosanen mit Bakterienkolonien und die damit einhergehende Aggregation. In allen Testsystemen, die auf Bakterienpopulationen basierten, konnte vereinzelt bei hohen Konzentrationen eine Stagnation der steigenden Inhibition gefunden werden. In den hohen Konzentrationen erreichte die Inhibition bis zu 100 %. In einigen Einzeltests kam es jedoch zu einem nicht monotonen Verlauf in der Konzentrations-Wirkungsbeziehung in hohen Konzentrationen, so dass keine 100 % Inhibition erreicht wurde. Vermutlich handelt es sich durch einen durch Stoffwechselprozesse der Bakterien hervorgerufenen Effekt oder es entsteht eine nicht sichtbare, kritische Mizellkonzentration im Zusammenhang mit der Zugabe der Bakterien. Allgemein ist bekannt, dass in hohen Konzentrationen die Faltung der Polymere zu- und die Anzahl reaktiver Gruppen abnimmt [Goy & Assis, 2014]. Doch ist Mizellbildung, beziehungsweise Selbst-Aggregation, nicht alleinig von der Konzentration der Ausgangssubstanz abhängig, sondern wird zusätzlich von äußeren Faktoren beeinflusst, wie Salzkonzentration, pH-Wert oder Temperatur [Liu et al., 2004]. Bakterien beeinflussen diese Faktoren lokal und könnten somit eine Selbstaggregation auslösen. Unter ungünstigen Lebensbedingungen bilden Bakterien an Oberflächen oder Grenzflächen Biofilme, indem sie extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) abgeben, die eine Bakterienkolonie mit einer hydratisierten Matrix einhüllt [Reisner et al., 2003]. Sie werden überwiegend in wässrigen Systemen gebildet. In dem vorliegenden Fall könnten somit die „Keimzellen“ eines Aggregats als Oberfläche für die Bildung eines Biofilms dienen und gleichzeitig die EPS die Selbst-Aggregation einleiten. Kommt es zu einer Ausdehnung des Konglomerats aus Biofilm und Aggregat wird dieses schwerer und sinkt zu Boden. Hierdurch nimmt die bioverfügbare Konzentration des Chitosans im Medium ab. Zusätzlich findet sich durch den Biofilm (Aggregat) eine Möglichkeit der Überdauerung. Das in Lösung verbliebene Chitosan kann nicht in den Biofilm (Aggregat) eindringen. Die Bakterien innerhalb des Biofilms (Aggregat) werden durch die EPS vor der Penetration toxischer Substanzen stärker geschützt und sind somit auch allgemein resistenter gegenüber Umweltbedingungen [Reisner et al., 2003]. Durch

die TEM-Aufnahmen war es aufgrund der Behandlung zur Konservierung nicht möglich intakte Zellgruppen umgeben von einem EPS zu beobachten, aber dennoch ist es denkbar, dass hierauf auch die reversible Wirkung der Chitosane beruht. Durch die Aggregation entsteht eine Verringerung der bioverfügbaren Konzentrationen und aufgrund der besseren Nährstoffbedingungen innerhalb des Biofilms können die persistenten Bakterien eine neue Population begründen [Lewis, 2001]. In den TEM-Untersuchungen konnten keine Biofilme nachgewiesen werden, da keine Proben aus Grenzflächen oder dem Bodensatz entnommen wurden, wo normalerweise Biofilme oder aggregierende Bakterien zu finden sind. Es wurden nur aus der kontinuierlich durchmischten Zellsuspension die Proben zur Analyse. Der Prozess der Fixierung selbst hätte zudem einen lockeren Zellzusammenhalt zerstört. Allerdings konnte beobachtet werden, dass nicht immer alle Bakterienzellen im gleichen Maße betroffen waren. Einige lagen bereits völlig zerstört vor, während vereinzelt bei anderen erst eine beginnende Vesikelbildung zu erkennen war (Abschnitt 3.3.2). Dies ließe sich durch unterschiedliche Positionen innerhalb eines Biofilms (Aggregat) erklären. Dieser Biofilm wurde eventuell beim Ziehen der Probe touchiert und dadurch unbeabsichtigt in die Untersuchung einbezogen. Aufgrund der verwendeten Analysemethode war es nicht möglich oder sinnvoll, die tatsächlich aktive Konzentration des Chitosans zu detektieren. Es hätte einer erneuten Sterilfiltration bedurft, was aber die Aggregate sowie Konglomerate, aber auch die gesamte Verteilung der vorhandenen Kettenlängen verfälscht hätte. Es bedarf daher weiterer Studien und einer Weiterentwicklung der Analysemethoden, um diese Thesen zu überprüfen.

Als Ergebnis ist festzuhalten, dass nicht die Zellwandchemie allein ausschlaggebend für die Wirkungsweise des Chitosans ist, sondern vielmehr die „Eigenheiten der Bakterien“ selbst (z.B. Stoffwechseleigenschaften wie „fakultativ anaerob“) und deren Anpassung an diverse Lebensumstände. Wachsende Kulturen sind durch Chitosan stärker angreifbar als nicht-wachsende oder in Biofilmen vorkommende Bakterienkulturen [Shrestha et al., 2010]. Innerhalb des Wachstumsprozesses werden in der Biogenese 40 bis 45 % der Zellwand neu aufgebaut bzw. umstrukturiert, wodurch diese für Chitosan angreifbar wird [Raafat et al., 2008]. Vermutlich ändert Chitosan die strukturelle Anordnung der Phospholipiddoppelschicht und stört somit die Permeabilität der Zellmembran [Chung & Chen, 2008].

Fazit: Es ist eine antibakterielle bzw. bakteriostatische Wirkung von Chitosanen nachweisbar, während keine fungizide oder fungistatische Wirkung aufgetreten ist. Der Wirkmechanismus der Chitosane ist bei Pilzen und Bakterien verschieden, so dass andere physikalisch-chemische Eigenschaften der Chitosane eine Rolle spielen. Bei den Bakterien ist zudem weniger die Zellwandchemie (Unterschied von grampositiven zu gramnegativen Bakterien) entscheidend, als vielmehr die Lebensbedingungen und Toleranzen der jeweils untersuchten Bakterien (z.B. Salztoleranz, Chitosanasevorkommen, fakultativ anaerob). Chitosane erzeugen evtl. Strukturen vermutlich in Interaktion mit der Zellwand, die eine sauerstoffarme Atmosphäre bewirken. Dies ruft Stress- und Abwehrmechanismen hervor und führt letztendlich zum Tod der Bakterien. Durch Eigenschaften der jeweiligen Bakterienart, kann dieser Effekt verringert werden.

Bei den physikalisch-chemischen Eigenschaften zeigte sich, dass hauptsächlich die Kettenlänge (DP) besonders im Zusammenhang mit dem Acetylierungsgrad (DPF), sowie der Acetylierungsgrad selbst (F_A) und das Acetylierungsmuster (P_A) beeinflussende Faktoren darstellen. Das Molekulargewicht zeigte keinen Einfluss auf die antibakterielle oder bakteriostatische Wirkung der Chitosane.

4.4 Biokompatibilität gelöster Chitosane

Die Untersuchung der biologischen Wirksamkeit der Chitosane sollte in der vorliegenden Arbeit nicht nur auf Mikroorganismen beschränkt bleiben, sondern einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Organismen und auch trophischen Ebenen beinhalten. Auf diese Weise ist es möglich, ein besseres Verständnis für die tatsächliche Wirkung zu entwickeln und auch die Auswirkung bei der Verwendung von Chitosanen im Hinblick auf ihre Biokompatibilität abzuschätzen.

4.4.1 Wirkung der Chitosane auf *Lemna minor*

L. minor ist eine weit verbreitete, freischwimmende Pflanze, die durch morphologische Reduktionen (keine Differenzierung in Blatt und Sproßachse) die Pflanzen in simplifizierter Form repräsentiert [Daubs, 1965]. Sie eignet sich aufgrund ihrer Sensitivität zur Detektion ungünstiger Umweltbedingungen. Obwohl normalerweise Chitosan als wachstumsfördernd und photosyntheseanregend beschrieben wird, kam es jedoch bei der einwöchigen Exposition mit Chitosan zu deutlichen Reaktionen, die sich in einer Wachstumshemmung und Änderung der Frondfärbung äußerten [Mondal et al., 2013; Mondal et al., 2012]. Die größte mittlere Hemmung des Wachstums erzielte das kurzkettige Chitosan X [0.44] mit 0.55 mg/L, gefolgt von Chitosan Y [0.10], Chitosan D [0.13] und Chitosan A [0.08] mit 2.69 mg/L, 3.01 mg/L und 4.41 mg/L sowie abschließend Chitosan B [0.02] mit 16.17 mg/L (Tab. 16).

Molekulargewicht und Polymerisationsgrad

Die kurzkettigen Chitosane erzielten eine deutlich stärkere Wirkung, als die langkettigen Chitosane. Chitosan X [0.44] rief in der geringsten Konzentration die ersten hemmenden Effekte (10 %ige Hemmung bei 0.1 mg/L) hervor und bei geringen Konzentrationen eine 90 %ige Hemmung (bei 2.98 mg/L). Von Chitosan B [0.02] hingegen bedurfte es der 10fachen Menge für einen vergleichbaren Effekt. Eine 90 %ige Hemmung wurde erst in sehr hohen Konzentrationen (1.75 g/L) erreicht. Normalerweise wird Chitosan ausschließlich im Zusammenhang mit antibakteriellen, antiviralen oder fungiziden Effekten untersucht, die das Pflanzenwachstum anregen oder die Abwehr verstärken, wobei nur einzelne Organe der Pflanze betrachtet werden. Innerhalb solcher Untersuchungen wurde festgestellt, dass Chitosan geringen Molekulargewichts effektiver in Bezug auf die Abwehr viral hervorgerufener pflanzlicher Infektionen ist [Kulikov et al., 2006]. Die Annahme einer Tendenz, dass diese kurzkettigeren Chitosane ebenfalls stärker wachstumshemmend wirken, konnte jedoch nicht durch Korrelationsuntersuchungen nachgewiesen werden. Eine schädigende Wirkung auf Pflanzen infolge einer Chitosanbehandlung wurde nur in seltenen Fällen erwähnt. Pospieszny und Atabekov berichteten, dass sich teilweise Chitosankonzentrationen über 0.25 % toxisch auf Bohnenpflanzen auswirkten [Pospieszny & Atabekov, 1989]. Vander und Mitarbeiter haben an Studien von *Triticum aestivum* L. herausgefunden, dass Chitosane, besonders mit einem mittleren Acetylierungsgrad ($F_A = 0.35$), den Ligningehalt der Zellwand beeinflussen und gleichzeitig nekrotische Zellveränderungen bewirken [Vander et al., 1998].

Acetylierungsgrad

In Bezug auf den Acetylierungsgrad wies Chitosan X [0.44] von den untersuchten Chitosanen den höchsten Acetylierungsgrad von 0.44 auf. Die Korrelationsanalyse nach Spearman ($p = 0.017$) deutete (ohne Bonferroni-Korrektur) ebenfalls auf eine Korrelation des EC_{10} -Wertes mit dem Acetylierungsgrad hin. Ein höherer Acetylierungsgrad des Chitosans ist dafür bekannt, dass er bei Pflanzen das Infektionsrisiko durch eine erhöhte Aktivität genereller pathogen-abhängiger Signalmoleküle vermindert [Falcón-Rodríguez et al., 2011]. In den vorliegenden Untersuchungen mit *L. minor* zeigte der erhöhte Acetylierungsgrad jedoch einen wachstumshemmenden Einfluss. Diese Ergebnisse deuteten klar darauf hin, dass unter kontrollierten und konstanten Umweltbedingungen (vergleichbar mit denen der Bakterienstudien – pH-Wert, Konzentration und Löslichkeit) ebenfalls

eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen Chitosan und *L. minor* bestand, was die Biokompatibilität von Chitosan entsprechend der Definition (siehe Abschnitt 1.5) in Frage stellt.

Monomere

Die Monomere zeigen eine dem Polymer entgegengesetzte Wirkung. Die Wirkung einer mittleren Hemmung des Wachstums von *L. minor* trat bei Glucosamin erst bei 48.87 mg/L und bei N-Acetylglucosamin bei 800.34 mg/L auf. Somit wirkten die Monomere 3 bis 50 Mal schwächer als das Chitosan mit der geringsten Wirkung (bezogen auf den EC_{50}). Es ist bekannt, dass Oligomere aus GlcNAc die Peroxidaseaktivität anregen, ebenso wie partiell acetylierte Chitosanpolymere [Vander et al., 1998]. N-Acetylglucosamin wirkte jedoch weniger stark wachstumshemmend auf *L. minor* als das Monomer Glucosamin, obwohl die Acetylgruppe die wachstumshemmende Wirkung vermeintlich forciert. Die großen Unterschiede in der Auswirkung der Chitosane im Vergleich zu ihren Monomeren wird auch in den positiven Effekten, z. B. der antiviralen Wirkung, beobachtet, wo für die Monomere keine antivirale Aktivität nachgewiesen werden konnte [Kulikov et al., 2006]. Die Mutmaßung liegt daher nahe, dass die Wirkung des Chitosans im Zusammenspiel der Substituenten liegt und damit auch dem Muster der Acetylierung eine wichtige Rolle zukommt.

Substitutionsmuster

Es konnte eine Korrelationen mit dem Muster der Acetylierung nach Spearman ($p < 0.017$) mit den EC_{10} -Werten, nach Pearson ($p < 0.023$; $p < 0.008$) mit den EC_{10} - und EC_{50} -Werten und durch die PCA ($p < 0.023$) mit den EC_{10} -, EC_{50} - und EC_{90} -Werten festgestellt werden (keine Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur). Bisher existieren keine systematischen Untersuchungen zum Einfluss des Musters der Acetylierung auf die biologische Aktivität. Eine verstärkte blockweise Anordnung der Substituenten unterteilt das Polymer in Bereiche mit Acetylgruppen und solchen mit Aminogruppen [Weinhold et al., 2009]. Diese Anordnung, wie sie näherungsweise bei Chitosan B [0.02] vorlag, scheint sich positiv auf die Biokompatibilität auszuwirken. Chitosan X [0.44] mit einer zufälligen Anordnung (beginnende Tendenz zur alternierenden Anordnung) wirkte sich scheinbar negativ auf die Biokompatibilität aus. Auf welchen Mechanismen diese Wirkung beruht, müssen weitere

Untersuchungen klären. Möglichweise wirken sich Muster der Acetylierung, die dem Muster eines möglichen Pathogens entsprechen, positiver auf die pflanzeigenen Abwehrmechanismen aus und fördern so deren Aktivierung.

Wirkungsspanne

Auch die Wirkungsspanne der Chitosane in den Experimenten mit *L. minor* war sehr divers und umfasste bei Chitosan A [0.08], B [0.02] und Y [0.10] mehrere Zehnerpotenzen, wohingegen Chitosan D [0.13] einen sehr engen Wirkungsbereich von 2.2 mg/L bis 8.2 mg/L aufwies (Abb. 33 und Abb. 34). Eine Korrelation zu physikalisch-chemischen Eigenschaften bestand nicht. Die langkettigeren Chitosane A [0.08], B [0.02] und D [0.13] bewirkten zusätzlich eine hormetische Reaktion, so dass geringe Konzentrationen positive Effekte hervorriefen, somit wachstumsfördernd waren. Es ist möglich, dass sich aktuelle Untersuchungen zur Wachstumsförderung teilweise auf diesen Effekt beziehen. Durch die gängige Exposition der Besprühung der Blätter dürfte nur eine geringe reale Konzentration an der Pflanze wirken. Ähnliches ist bei Zugabe kleiner Mengen in die Rhizosphäre zu erwarten, da tatsächlich nur geringe Konzentrationen pro Pflanze oder Wasserkörper aktiv vorhanden sein dürften. In Pflanzenstärkungsuntersuchungen von Falcón-Rodríguez und Mitarbeitern ist zu erkennen, dass nicht immer die höchsten Chitosankonzentrationen, sondern teilweise auch die niedrigsten Konzentrationen die höchste Abwehrrate gegen *Phytophthora nicotianae* in Tabakpflanzen hervorrufen [Falcón-Rodríguez et al., 2011]. Auch von kurzen Chitosan oligomeren ist bekannt, dass sie sich positiv auf die Photosyntheseleistung von Mais- und Sojapflanzen auswirken, verbunden mit einem Anstieg der Transpirationsrate [Khan et al., 2002]. So erstaunt es nicht, dass bei den Monomeren ebenfalls eine ausgeprägte Hormese auftrat. Konzentrationen < 33 mg/L (GlcN) und 224 mg/L (GlcNAc) wirkten sich wachstumsfördernd auf die Pflanzen aus.

Morphologie

Der morphologische Vergleich (Abb. 35 bis Abb. 38) zeigte ebenfalls, dass geringe Konzentrationen von 0.01 mg/L (Chitosan A [0.08] und B [0.02]) oder 0.1 mg/L Chitosan D [0.13] einen positiven Einfluss auf die Farbe und Größe der *L. minor* Pflanzen nahmen. Aufgrund der detektierten hormetischen Effekte ist davon auszugehen, dass die Photosynthese angeregt wurde [Mondal et al., 2013]. Mit zunehmender Chitosankonzentration stieg der negative Einfluss auf das Photosystem, was die Fronds der chitosanbehandelten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen hellgrüner erschienen

ließ [Eberius, 2001]. Oberhalb der mittleren hemmenden Konzentration waren bei allen chitosanbehandelten Lemnapflanzen deutliche Hinweise auf Chlorose und Nekrose aufgetreten. Dies lässt sich bei *L. minor* auf eine verminderte Chlorophyllsynthese aufgrund ungünstiger Lebensbedingungen zurückführen [Landolt, 1986; OECD, 2006]. In höheren Konzentrationen war zu erkennen, dass die Mutterzellen der ersten Teilung im Absterben begriffen waren, da eine vollständige Nekrose und damit Zersetzung des Frondgewebes eingetreten war. Die in den morphologischen Untersuchungen eingesetzten Chitosane hatten alle einen Acetylierungsgrad < 0.15 , doch wurde das Auftreten nekrotischen Blattgewebes ebenfalls für Chitosane mittleren Acetylierungsgrades beschrieben [Vander et al., 1998]. Die Tochterzellen wiesen nur leichte gelbliche Flecken auf. Diese beginnenden Stadien der Chlorose sind im Gegensatz zur Nekrose noch reversibel [OECD, 2006]. Neben der verminderten Anzahl der Teilungen wuchsen die Tochterzellen in Abhängigkeit zur Chitosankonzentration nicht mehr zu ihrer vollen Größe aus, bevor sie in den nächsten Teilungsprozess übergingen. Hierdurch wurden die Pflanzen immer kleiner. Möglicherweise trug das osmotische Potential des Chitosans zu der Reduktion der Frondfläche der Tochterzellen bei. In Versuchen durch Hillman kommt es bei Verringerung des osmotischen Potentials des Nährmediums zur Ausdehnung der Wurzeln und der Fronds. Dieser Effekt ließ sich durch Saccharose ins Gegenteil verkehren, jedoch nicht durch Laktose oder Manitol [Hillman, 1961]. Es wird zumindest davon ausgegangen, dass sich durch den Einsatz von Chitosan das osmotische Potential ändert. Unklar ist bislag jedoch, ob Chitosan die Änderung direkt bewirkt oder es nur als Folge der Chitosanwirkung entsteht [Raafat et al., 2008].

Die Schrumpfungen von Mutter- zur Tochtergeneration setzten sich auch über vier Wochen fort. Nach vier Wochen überlebten ausschließlich die kleinen Tochterpflanzen. Die größeren Mutterpflanzen waren nekrotisch, bzw. abgestorben, und wurden durch Mikroorganismen zersetzt. Der pilzliche Bewuchs und das vorhandene schleimige Sekret in Abhängigkeit zur Chitosankonzentration sprachen für Zersetzungsprozesse und Auflösung des Parenchyms [Webster & Benfield, 1986]. Zusätzlich waren immer wieder, sowohl in den einwöchigen als auch in den vierwöchigen Experimenten, Veränderungen der Morphologie in Bezug auf die vegetative Vermehrung aufgetreten. Die Tochterzellen lösten sich nicht von der Mutterzelle, gingen aber dennoch in den nächsten Teilungszyklus über. Durch das Aufliegen der Fronds der Mutterpflanze auf dem Wasser war die Chitosanaufnahme sowohl durch die Frondunterseite als auch über die Wurzel möglich [Guimarães et al., 2011]. Bei den Tochterpflanzen war durch die Wuchsform die Chitosanaufnahme hingegen nur noch vermindert über die Blätter möglich. Ob der Prozess der Abtrennung nach der Sprossung

durch Chitosan gestört wurde oder durch ein orthogonales Wachstum der Kontakt der Unterseite mit der Wasseroberfläche verringert werden sollte, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Fest steht, dass auch die Tochterzellen nekrotische Bereiche aufwiesen, so dass Teile des Pflanzengewebes abstarben und somit eher von einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit, als von einer gerichteten Anpassung ausgegangen werden kann.

Adaption an Chitosan

Bezüglich der Anpassungsfähigkeit von *Lemna*-Pflanzen ist aus Schwermetallanalysen bekannt, dass *L. minor* innerhalb der ersten sieben Tage mit Wachstumshemmung auf ungünstige Bedingungen reagiert. Bei Verlängerung der Exposition beginnt die Pflanze jedoch durch eigene Abwehrmechanismen dies zu überwinden [Horvat et al., 2007]. Die Ergebnisse aus den *Mixed-effects models* (Abb. 39 bis Abb. 41) zeigten jedoch auf, dass nur bei den niedrigen Konzentrationen (2.4 und 4.8 mg/L) von Chitosan B [0.02] innerhalb von vier Wochen eine „Erholung“ des Wachstums und damit eine Adaption an die Chitosanbedingungen als signifikant nachzuweisen war. Bei Chitosan A [0.08] war nur eine leichte Adaptionen von der ersten zur vierten Woche festzustellen und bei Chitosan D [0.13] lag keine Erholung des Pflanzenwachstums vor. Der EC₁₀-Wert von Chitosan D [0.13] lag bei 2.15 mg/L. Die EC₁₀-Werte von Chitosan A [0.08] und B [0.02] lagen mit 0.1 mg/L und 1.1 mg/L noch darunter. Die Adaption scheint somit unabhängig vom Eintreten der ersten Hemmung oder dem EC₅₀-Wert zu sein. Vielmehr gibt die Wirkungsspanne Auskunft über die Intensität der Wirkung. Chitosan B [0.02] mit einer engen Wirkungsspanne erzeugte irreversible Schädigungen, wohingegen Chitosan A [0.08] und B [0.02] mit einer breiten Wirkungsspanne in niedrigen Konzentrationen eine positive Wachstumsentwicklung über mehrere Wochen bewirkten. Warum Chitosan D [0.13] eine so rasche Wirkung im Vergleich zu den anderen untersuchten Chitosanen zeigte, ist unklar und konnte statistisch auf keine der physikalisch-chemischen Eigenschaften zurückgeführt werden. Einzig die Ergebnisse aus der Schwermetallanalytik lassen erkennen, dass Chitosan D [0.13] von den Chitosanen A [0.08], B [0.02] und D [0.13] am stärksten mit Schwermetallen belastet war (Tab. 8). Besonders die Belastung mit Nickel lag 2.5fach höher als bei Chitosan A [0.08] und betrug ¼ der bekannten Grenze der Trinkwasserverordnung von 2001 [TrinkwV, 2001]. *L. minor* gilt als besonders sensitiv gegenüber Schwermetallen und die beobachteten Reaktionen sind ebenfalls typisch für Schwermetallvergiftungen [Khellaf & Zerdaoui, 2009]. Doch obwohl besonders Nickel hoch toxisch für diese Pflanzen ist, überschreiten die EC₅₀-Werte von Schwermetallen aus vergleichbaren Untersuchungen an *L. minor* die in den vorliegenden Untersuchungen durch

Chitosan eingebrachten Konzentrationen um das 100 bis 1000fache und beeinträchtigten nicht den Gehalt an Chlorophyll oder Carotinoiden [Hou et al., 2007; Wang, 1986]. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die eingetragenen Schwermetalle ausschlaggebend das Wachstum oder die morphologische Entwicklung von *L. minor* beeinflusst haben.

Substanzkontrollen

Neben den Chitosanen wurden auch Substanzkontrollen mit Natriumchlorid und Natriumacetat durchgeführt (Abb. 34). Bei den eingesetzten Chitosankonzentrationen, die die Wirkungsspanne des jeweiligen Chitosans eingrenzten, wurde die Wirkung nicht durch Natriumchlorid oder Natriumacetat beeinflusst. Ausschließlich bei Chitosan B [0.02] oberhalb einer Konzentration von 550 mg/L ($> EC_{50}$) konnte eine beginnende Beeinflussung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch Natriumacetat nicht ausgeschlossen werden (EC_{10} des Natriumacetats = 0.55 mM). Da Chitosan B [0.02] jedoch das Chitosan mit der geringsten negativen Wirkung in den vier Wochen Experimenten darstellte, ist nicht von einer negativen Beeinflussung durch Natriumchlorid oder Natriumacetat auszugehen.

pH-Wert

Dass es nur wenige Literaturhinweise gibt, die auf eine Schädigung von eukaryotischen Zellen durch Chitosan hindeuten, ist vermutlich dem pH-Effekt geschuldet. Die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs sind unter konstant sauren pH-Wert-Bedingungen entstanden (Voreinstellung 5.5). In vielen Untersuchungen wird der pH-Wert nicht über die Dauer des Versuchs kontrolliert und es erfolgt nur eine partielle Exposition (z.B. der Blätter). Es wird keine dauerhafte Bioverfügbarkeit durch konstante saure pH-Bedingungen gewährleistet. Steigt der pH-Wert in den neutralen Bereich, nimmt die Bioverfügbarkeit des Chitosans deutlich ab (ab einem pH-Wert von 6,1) [Domard, 1987]. Die Vergleichbarkeit derartiger Versuche mit den vorliegenden Experimenten ist daher nur eingeschränkt gegeben.

Fazit: Die Biokompatibilität für stark exponierte Individuen in saureren pH-Bereichen konnte nicht bestätigt werden. *L. minor*-Pflanzen werden durch Chitosan deutlich in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Hierbei zeigten sich besonders der Acetylierungsgrad und das Muster der Acetylierung in Korrelationsversuchen als einwirkende Komponente.

4.4.2 Wirkung von Chitosan auf Hepatozyten unter neutralen pH-Konditionen

In der Abschätzung der biologischen Wirkung von Chitosanen ist es sinnvoll, potentiell exponierte Zellen des menschlichen Gewebes mit in die Betrachtung einzubeziehen. Durch den Einsatz von Chitosanen als Wundheilmittel [Wedmore et al., 2006], als Dosiersystem für Arzneimittel [Prabaharan & Mano, 2005] und vor allem als Diätmittel [dieta-natura, 2015] gelangen Chitosane in den menschlichen Organismus und in den Darm. Innerhalb des Gastrointestinaltrakts finden keine Wechselwirkungen mit Chitosanen statt [Rinaudo, 2006]. Doch ein großer Teil oral verabreichten Chitosans erreicht nach ca. 30 min. die Leber [Kean & Thanou, 2010]. Die in den vorliegenden Versuchen verwendeten Hepatozyten der Zelllinie Hep G2 sind morphologisch und physiologisch den parenchymalen Leberzellen menschlichen Gewebes sehr ähnlich [Aden et al., 1979], so dass anhand des Testverfahrens ein Einblick in die Wirkung von Chitosanen bei neutralem pH-Wert auf menschliches Gewebe gewonnen werden konnte.

Aufgrund der Wachstumsbedingungen von Hepatozyten war es nicht möglich, die Versuche in einem sauren pH-Milieu durchzuführen. Hierdurch lag keine monotone Konzentrations-Wirkungsbeziehung vor, die über ein Modell entsprechend statistisch ausgewertet werden konnte. Der neutrale pH-Wert bewirkte eine Aggregation, doch das zugegebene Chitosan stand auch nach Aggregation durch die adhärente Lebensweise der Zellen mit ihnen in direktem Kontakt. Die Chitosanaggregate sanken zu Boden. Die dort feststehenden Zellen wurden dadurch mehr von den Aggregaten als vom gelösten Chitosan beeinträchtigt. Über die Freisetzung des LDH war die Beeinträchtigung der Zellen messbar, was Rückschlüsse auf die Toxizität der eingesetzten Substanzen erlaubte [Korzeniewski & Callewaert, 1983]. In Anbetracht der differierenden pH-Wert Anforderungen von den Hep G2-Zellen und den Chitosanen waren zwar keine Risikoabschätzungen möglich, doch ließen sich deutliche Hinweise auf eine konzentrationsabhängige Freisetzung von LDH durch die Zugabe von Chitosanen finden (Abb. 42), auch wenn nur die nominale und nicht die reale Konzentration berücksichtigt werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass Chitosane in hohen Konzentrationen bei neutralem pH-Wert eukaryotische Zellen schädigen, so dass die strukturelle Integrität beeinträchtigt wird. Es ließ sich ein leichter Einfluss des Molekulargewichts ausmachen, da es scheinbar einer geringeren Konzentration an langkettigeren Chitosanen, wie Chitosan A [0.08] und D [0.13], bedurfte, um eine ähnliche Menge an LDH freizusetzen wie unter der Behandlung mit Chitosane B [0.02] und Y [0.10]. Wie im Versuch (Abschnitt 3.4.3) rekonstruiert, würde bei einer natürlichen Exposition unter den pH-Bedingungen (pH-Wert > 7) die Leberzellen dennoch mit Chitosan in Kontakt kommen. Hierbei nimmt der bioverfügbare Teil der flüssigen Phase ab und es treten

Aggregate geringer Größe auf, wie sie im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden konnten (Abb. 20). Im Versuchsverlauf konnte des Öfteren beobachtet werden, dass diese Chitosane zusammen mit den Leberzellen eine filmartige Struktur eingingen und eine einheitliche Matrix bildeten. In Untersuchungen von Wang und Mitarbeitern bieten Chitosane in Kombination mit Collagen eine geeignete Matrix für das Anwachsen von Leberzellen ohne zytotoxische Effekte zu verursachen [Wang et al., 2003]. In höheren Konzentrationen konnten in den vorliegenden Versuchen jedoch eine Schädigungen der Zellen nachgewiesen werden.

Analog zu den Beobachtungen bei Bakterien, welche auf Chitosan reagieren, als wenn sie einer sauerstoffarmen Umgebung ausgesetzt sind, wäre es auch bei den Untersuchungen mit den Leberzellen möglich, dass Chitosan in ausreichend hoher Konzentration nicht mehr eine Matrix für oder mit den Leberzellen bildet, sondern eine sauerstoffarme Umgebung schafft [Raafat et al., 2008]. Diese würde dann eine Schädigung vergleichbar mit der vorliegenden erklären, da durch einen Sauerstoffmangel über verschiedenste Faktoren eine Nekrose der Zellen eingeleitet wird [Arora et al., 1996]. Vergleichbare Studien sind bislang in der Literatur nicht aufgeführt. Allerdings könnte in durchblutetem Gewebe der durch Chitosan hervorgerufene Sauerstoffmangel durch die reguläre Sauerstoffzufuhr über die Blutgefäße nivelliert werden, so dass unter natürlichen Bedingungen keine messbaren Schäden entstehen. Zudem müsste auch die Chitosankonzentration entsprechend hoch sein, um einen negativen Effekt auszulösen. Es ist jedoch eine verstärkte Akkumulation besonders von Chitosanen mit höheren Molekulargewichten in der Leber bekannt [Richardson et al., 1999].

Fazit: Die Experimente im neutralen pH-Bereich konnten nicht durch eine statistische Analyse ausgewertet werden. Allerdings zeigte die Freisetzung von LDH, dass eine Schädigung von Hepatozyten phenomänologisch bei hohen Konzentrationen vorliegt. Die Wechselwirkung des Chitosans mit den adhärennten Leberzellen sollte daher näher untersucht werden. Insbesondere in wie weit die Filmbildung der Chitosane um die adhärennten Zellen deren Wachstum beeinträchtigt und ob dieses auf einen intakten Organismus übertragbar ist. Es ist nicht auszuschließen, dass ein Sauerstoffabschluss, wie er ähnlich bei den Bakterien vermutet wird, verantwortlich für die gezeigte Wirkung ist.

4.5 Antimikrobielle Wirkung versus Biokompatibilität der Chitosane

4.5.1 Methodische Aspekte

In den Studien wurde ausschließlich α -Chitosan verwendet. Die α -Struktur wurde nicht explizit verifiziert, allerdings ist davon auszugehen, dass keine β -Strukturen vorliegen, wenn das Material durch Rekristallisierung gewonnen wurde [Rinaudo, 2006].

Im Allgemeinen ist die Untersuchung von Chitosan immer auch eine Suche nach einem Kompromiss und einem gemeinsamen Nenner. Es war nicht möglich, die Wirkung dieser Chitosane gänzlich ohne sekundäre Beeinträchtigung vorzunehmen, sprich durch Effekte des pH-Wertes auf das Testsystem oder Effekte des Testsystems auf das Chitosan. Wird Chitosan als Feststoff dem Test zugegeben, erfährt es beispielsweise im Agarostest eine thermische Beeinflussung (Autoklavieren). Zudem ignorieren alle agarbasierenden Untersuchungen die unterschiedlichen Kettenlängen, die sich als Gemisch in der Chitosanlösung befinden. Die kürzeren Ketten haben eine andere Diffusionseigenschaft als die langen Ketten, wodurch in den Agardiffusionstests immer nur eine Fraktion untersucht wird. Bei lösungsbasierten Untersuchungen gibt es immer eine Grenze der Löslichkeit, ab der sich Mizellen (Aggregate) formen. Hierdurch wird in hohen Konzentrationen oder bei steigendem pH-Wert zunehmend das Chitosan der Bioverfügbarkeit entzogen und das eingesetzte Chitosan kann nicht in seiner vollen Wirkung untersucht werden. Diese Untersuchungen gehen daher oft mit einer starken Interpolation einher. Liegt der Wunsch vor, eine Einschätzung über die Wirksamkeit der Chitosane und deren Zusammenhänge mit der Struktur vorzunehmen, muss immer ein gewisses Maß an Skepsis bei der Interpretation der Ergebnisse und dem Vergleich mit Ergebnissen aus der Literatur mit einfließen. Die Eingangsparameter des Chitosans können sich innerhalb einer biologischen Untersuchung bzw. ebenfalls innerhalb der chemischen Analyse ändern. Aufgrund dessen wurde in den vorliegenden Untersuchungen auch nur auf die Nominalkonzentration (eingesetzte Konzentration) Bezug genommen, da unter realen Bedingungen eine absolute Löslichkeit von Chitosan nicht gewährleistet werden kann. Im Zusammenspiel mit Bakterien kann die Realkonzentration teilweise schwer abschätzbar sein, da diese von konzentrations-, temperatur- und zeitabhängigen Interaktionen beeinflusst wird.

Solange über die Natur der Aggregate aus Chitosan und Bakterien nichts näher bekannt ist, geben die Ergebnisse bei allen Versuchen, die in Lösung stattfinden, immer eine kombinierte Wirkung mit einer unbekanntem Einflussgröße wieder. Ab einem bestimmten Punkt liegt vermutlich eine Konzentration vor, die zu einer Aggregation der Chitosane und/oder der

Bakterien führt. Die Bildung der Aggregate wird dabei jedoch durch die Dichte der Bakterienzellen selbst beeinträchtigt. Diese Interaktion ist jedoch auch gleichzeitig Teil des Wirkmechanismus der Chitosane und kann bei der Untersuchung nicht unterbunden werden [Liu et al., 2006].

Darüber hinaus können sich etliche Parameter, die alle ein fest integrierter Bestandteil (die Gesamtheit der physikalisch-chemischen Eigenschaften) des Chitosans sind, auf den Effekt auswirken [Kofuji et al., 2005]. Erst wenn es möglich ist Polymere synthetisch herzustellen, die sich nur in einem Parameter unterscheiden, kann eine systematischere Untersuchung vorgenommen und damit ein größerer Erkenntnisgewinn erwartet werden. Bis dahin wird mit der Verwendung eines Chitosans im Vergleich zu einem anderen immer eine Vielzahl an Parametern geändert, was eine gezielte signifikante Zuordnung erschwert.

Bei Chitosan handelt es sich nicht um eine klar charakterisierte Einzelsubstanz [Roberts, 2007]. Die Komplexität der Chitosane selbst zeigte die Relevanz einer eigenen Analyse der eingesetzten Chitosane. Chitosanparameter, wie sie vom Hersteller angegeben werden, sind meist irreführende Hinweise und entsprechen nicht den Parametern des später eingesetzten Chitosans. Denn auch das gängige Verfahren der Lösung in Essigsäure beeinträchtigt die Chitosane ungleichmäßig, so dass nach der durchgeführten Löslichkeitsbehandlung eine erneute Analyse nötig ist. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass Chitosane immer entsprechend einer individuellen Verteilungskurve aus einem Gemisch aus Ketten unterschiedlicher Länge und Anzahl bestehen. So sind bei langkettigen oder Chitosanen mit einem hohen Molekulargewicht auch immer kurze Ketten beteiligt, deren Auswirkungen nicht isoliert betrachtet werden können. In weiteren Versuchen sollten daher Chitosane in gezielten Fraktionen untersucht werden, um die Zusammensetzung näher zu verstehen und die daraus resultierende Wirkung genauer zu klären.

Fazit: Jeglicher Einsatz von Chitosan beeinträchtigt die Eigenschaften des Chitosans. Sei es, dass thermische, chemische oder sterische Veränderungen durch das Lösungsverfahren vorgenommen werden oder durch die Untersuchung selbst, beispielsweise durch die Interaktionen mit Bakterien, die Chitosane verändert werden. Jegliches Ergebnis stellt daher nur eine Annäherung dar.

4.5.2 Bioverfügbarkeit im biologischen System

Die Untersuchungen an Rattenleukämiezellen (Daten nicht gezeigt) verliefen ergebnislos. Die Tests waren nicht reproduzierbar und das Testsystem zeigte eine hohe Anfälligkeit gegenüber den Begleitsubstanzen Natriumchlorid und Natriumacetat. Es war nicht möglich, nicht

invasive Testbedingungen zu schaffen und gleichzeitig die Stabilität des Chitosans in Lösung aufrechtzuerhalten. Allgemein sind Testsysteme mit höheren Organismen zum Vergleich mit antibakteriellen Untersuchung von Chitosanen kaum möglich, da die pH-Wert Anforderungen zu unterschiedlich sind. Eukaryotische Zellen bedürfen eines neutralen pH-Werts, wohingegen Chitosane nur im sauren Milieu löslich und antibakteriell wirksam sind [Kumirska et al., 2011]. Oberhalb eines pH-Werts von sieben ist die Bioverfügbarkeit deutlich herabgesetzt und es sind auch nur noch geringe antimikrobielle Effekte nachweisbar [Helander et al., 2001; Li et al., 2008a; Li et al., 2008b]. Hierin liegt jedoch auch der enorme Vorteil des Chitosans. Eingesetzt gegen Bakterien in saurer pH-Umgebung ist es sehr effektiv. Inkorporiert das Chitosan jedoch in einen menschlichen oder tierischen Körper, wird es in dem vorliegenden neutraleren pH-Wert durch Aggregation nahezu unschädlich. Es findet keine Resorption statt, sondern vielmehr eine Depolymerisation durch Lysozyme [Vårum et al., 1997]. Bei Passage der Leber ist erst bei Akkumulation einer sehr hohen Dosis mit Schäden zu rechnen.

Vorsicht ist jedoch bei stärkerer Exposition der Umwelt geboten, sobald es sich um Grenzbereiche handelt. Einige Gewässer und Waldböden zeigen pH-Werte unterhalb des neutralen Bereichs. Aufgrund der Schwierigkeiten eukaryotische Testsysteme in einem sauren pH-Milieu zu untersuchen, finden die meisten Tests zur Biokompatibilität bei pH-Werten > 7 und die äquivalenten antibakteriellen Tests bei pH-Werten < 6 statt [Kean & Thanou, 2010]. Jedoch gibt es, wie in vorliegende Tests bestätigt werden konnte, Eukaryoten, die bei pH-Werten < 7 ihr Optimum besitzen und dennoch von Chitosan negativ in ihrem Wachstum beeinträchtigt werden (vgl. Ergebnisse *L. minor*).

Fazit: Ergebnisse aus Testsystemen mit einem pH-Wert > 7 haben oftmals wenig Aussagekraft, da die mangelnde Bioverfügbarkeit die aktive Konzentration auf ein unkalkulierbares Maß herabsetzt. Biokompatibilitätsuntersuchungen sollten daher unter ähnlichen Bedingungen stattfinden, wie die Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung, um eine Aussage treffen zu können.

4.5.3 Vergleichende Wirkung von Chitosanen auf Pro- und Eukaryoten

L. minor war eines der wenigen eukaryotischen Testsysteme, die in einem sauren pH-Milieu optimale Bedingungen vorfanden. Die Tests haben gezeigt, dass durchaus auch eukaryotische Zellen durch Chitosan Schaden nehmen können, wenn die Bioverfügbarkeit gewährleistet ist. Eine gleichzeitig inhibierende Wirkung von Chitosanen auf pathogene Bakterien in kombinierten Testsystemen ist hingegen nicht gewährleistet [Zhang et al., 2010]. Die

mittleren inhibierenden Konzentrationen bei *Lemna* liegen dabei jeweils mindestens 10 mg/L unterhalb der wirksamen Konzentration, die bei den Bakterien eine mittlere Wachstumsinhibition verursachten. Doch die Reihenfolge der Reaktivität der Chitosane ist bei den Bakterien vertauscht, so wirkt Chitosan X [0.44] am stärksten und Chitosan B [0.02] am schwächsten gemessen an den EC₅₀-Werten. Bei den meisten bakteriellen Untersuchungen war dies umgekehrt. Chitosan X [0.44] zeigte wenig bis keine Wirkung, wohingegen Chitosan B [0.02] in den überwiegenden Fällen die deutlichste Veränderung bewirkte.

Eventuell lässt sich dies anhand des Nebeneffektes begründen, dass Chitosane mit einem höheren Acetylierungsgrad eher dazu neigen, gelartige Strukturen anzunehmen [Sorlier et al., 2001]. Dies könnte sich beeinträchtigend auf den Gasaustausch bei *L. minor* auswirken und bei den Bakterien eher zur Bildung von Biofilmen führen, in dem die Bakterien mehr geschützt vorliegen. Hierbei könnte dem pH-Wert ein kumulativer Effekt zukommen, da dieser auf die Konformation und Komplexbildung des Chitosans einwirkt [Domard, 1987]. Die Untersuchung der Monomere birgt hierbei keinen Erkenntnisgewinn, da sie nicht die Wirkung der Chitosane bzw. des Chitins widerspiegeln, sondern isoliert betrachtet werden müssen. Der Effekt ist nicht selten sogar entgegengesetzt den Systematiken, die bei der Wirkung der Polymere wichtig sind, was wiederum auf den unterschätzten Stellenwert des Musters der Acetylierung hindeutet.

Fest steht, dass Chitosane eine Interaktion mit der jeweiligen Zellwand des Zielorganismus eingehen und dort unterschiedlich wirken. Die bakterielle Membran ist aus einer Phospholipidschicht aufgebaut, die in unterschiedliche anionische Komponenten eingebettet ist. Es wird davon ausgegangen, dass Chitosan als Polykation mit der negativ geladenen Zellwand interagiert [Chung & Chen, 2008]. Wang und Mitarbeiter beschreiben unterdessen, dass Membranlipide, darunter Phosphoethanolamine oder Cardiolipide, in Interaktionsprozessen mit polykationischen Peptiden dazu neigen, von der lamellaren Form in kubische oder hexagonale Formen überzugehen. Tierische Membranen, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht mit eingebettetem Cholesterol, verbleiben hingegen selbst unter verschiedenen Stress-Bedingungen in ihrer lamellaren Form [Wang et al., 2012]. Bei Pflanzen wiederum konnte eine Veränderung des Ligningehaltes unter Einfluss des Polykations Chitosan nachgewiesen werden [Vander et al., 1998]. Die genauen Vorgänge an den unterschiedlichen Membranen sind bislang jedoch noch nicht geklärt und bedürfen weiterer Forschung.

Fazit: Im Vergleich der Korrelationsergebnisse fällt auf, dass die Bakterien in ihrem Wachstum besonders durch Chitosane mit einem niedriger F_A oder niedrigem P_A am stärksten in ihrem Wachstum inhibiert werden (vgl. Ergebnisse aus dem Proliferationsassay und *V. fischeri*). Die Wirkung auf *L. minor* als Vertreter der Eukaryoten ist entgegengesetzt. Ein hoher F_A oder ein hoher P_A wirken sich negativ auf das Wachstum von *L. minor* aus. In keinem der Textsysteme konnte nachgewiesen werden, dass ein hohes oder niedriges Molekulargewicht (detektiert nach der Löslichkeitsbehandlung) für einen Effekt ausschlaggebend war.

4.6 Fazit und Ausblick

In der Literatur herrscht Uneinigkeit über die Zuordnung der entscheidenden physikalisch-chemischen Eigenschaften der Chitosane zu der jeweiligen untersuchten Wirkung. Dass sich viele Untersuchungen auf Herstellerangaben berufen, kann die Ursache für diese Konfusion sein. Die Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften durch Lösungsmittel oder Sterilisationsmethoden wird nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund werden einer physikalisch-chemischen Eigenschaft, die so nicht mehr vorliegt, Wirkungen zugeschrieben. Beispielsweise wird das Molekulargewicht zu Beginn angegeben, jedoch nach dem Autoklavieren nicht erneut untersucht. Resultierende Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen beziehen sich dann anschließend auf das eingangs vorliegende Molekulargewicht, das sich jedoch durch die Sterilisation ändert. Bei den vorliegenden Untersuchungen verschiedener Chitosane, wurde besonderer Wert auf die genaue Detektion der physikalisch-chemischen Eigenschaften nach jeglichem manipulierendem Eingriff gelegt, um somit eine eindeutige Zuordnung gewährleisten zu können. Hierbei stellte sich heraus, dass besonders dem Acetylierungsgrad und dem Muster der Acetylierung eine Schlüsselrolle in der Vereinbarkeit von antibakteriellem Verhalten und Biokompatibilität zuzukommen scheint. Ein niedriger F_A und ein niedriger P_A scheinen besonders geeignet, eine gute antibakterielle Wirkung zu erzielen und gleichzeitig die Biokompatibilität auch für stark exponierte Eukaryoten zu gewährleisten. Dies liegt begründet in der unterschiedlichen Interaktion der positiv geladenen Gruppen des Chitosans mit den jeweiligen Membranen. Gleichzeitig scheinen jedoch auch unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften auf verschiedene Bereiche beim Bakterium zu wirken, so dass der Polymerisationsgrad die Aktivität der Dehydrogenase beeinträchtigt und das Wachstum durch den Acetylierungsgrad beeinflusst wird. Für eine signifikante Aussage müssten allerdings auch die in der Literatur verwendeten Chitosane entsprechend detailliert analysiert und getestet werden. Gleichzeitig sind die übrigen physikalisch-chemischen Eigenschaften, die ein Chitosan beschreiben, zu flexibel, um signifikante Aussagen zu treffen. Bei einer Aussage zu einem mittleren Molekulargewicht ist

nicht bekannt, welche weiteren Molekulargewichte der einzelnen Ketten und in welcher Anzahl diese vorliegen. Darüber hinaus ist nicht abschätzbar, welchen Einfluss diese Ketten ausüben. Anhand der Monomere war deutlich erkennbar, dass von den Eigenschaften der Monomere oder definierter kurzkettiger Oligomere nicht auf die Wirkung langkettiger Chitosan Polymere geschlossen werden darf. Es müsste eine sehr große Anzahl Chitosane nach gleichem detaillierten Standard analysiert und mit den Testsystemen untersucht werden, bevor weitere Fortschritte auf diesem Gebiet zu erwarten sind. Am sinnvollsten wäre die Untersuchung gezielter Fraktionen der bereits untersuchten Chitosane. Die Fraktionen müssten so beschaffen sein, dass beispielsweise die Ketten nach Molekulargewichten getrennt vorliegen und jedes Chitosan einer Fraktion auch nur einen Acetylierungsgrad aufweist. Auch die übrigen physikalisch-chemischen Eigenschaften müssten eindeutig definierbar oder zumindest stark eingegrenzt werden, um Rückschlüsse auf die einzelnen aktiven Komponenten innerhalb eines langkettigen Chitosans ziehen zu können. Alternativ müssten diese langkettigen Chitosanmoleküle synthetisch erzeugt werden, bei denen sich physikalisch-chemischen Eigenschaften gezielt und für alle Ketten innerhalb einer Chitosanlösung gleichermaßen steuern lassen. Bislang ist dies jedoch nicht realisierbar.

Die Biokompatibilität wurde bislang nur bei neutralen oder alkalischen pH-Bereichen nachgewiesen, doch nicht bei sauren pH-Bedingungen. Entweder ist somit in den Tests, die in der Literatur durchgeführt wurden, das Chitosan „inaktiv“ oder den eukaryotischen Zellen war grundsätzlich kein Überleben in den untersuchten pH-Bereichen möglich. Der Vergleich von Biokompatibilität und bakterizider Wirkung unter solchen Bedingungen ist daher unberechtigt. Durch den Test mit *Lemna*-Pflanzen im sauren pH-Bereich konnte gezeigt werden, dass eine Differenzierung der Biokompatibilität nötig ist. Eukaryotische Zellen sind im neutralen bis basischen pH-Bereich aufgrund der unzureichenden Löslichkeit nicht durch Chitosan beeinträchtigt. Die im sauren pH-Milieu wachsenden Pflanzen sind jedoch durch Chitosan in ihrem Wachstum gehemmt. Doch anhand der vorliegenden Untersuchungen lässt sich tendenziell erkennen, dass viele physikalisch-chemischen Eigenschaften der Chitosane zusammen eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung verursachen, sich jedoch ein niedriger Acetylierungsgrad positiv auf Pflanzen und negativ auf Bakterien auswirkt. Gleiches gilt für das Muster der Acetylierung. Zusammengenommen gibt es somit biokompatible Chitosane mit bakteriostatischen Eigenschaften. Das optimale Chitosan wird allerdings erst gefunden werden, wenn eine synthetische Herstellung langkettiger einheitlicher Polymere mit definierten physikalisch-chemischen Eigenschaften möglich ist.

5 Literatur

- Addadi, L., D. Joester, F. Nudelman, and S. Weiner, 2006, Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes: *Chemistry – A European Journal*, v. 12, p. 980-987.
- Aden, D. P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov, and B. B. Knowles, 1979, Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line: *Nature*, v. 282, p. 615-616.
- Ahlf, W., 2007, Comments on the article 'Optimisation of the solid-contact test with *Arthrobacter globiformis*' [J Soils Sediments 6 (4) 201-207 (2006)]: *Journal of Soils and Sediments*, v. 7, p. 67-67.
- Ahmad, A. L., S. Sumathi, and B. H. Hameed, 2005, Adsorption of residue oil from palm oil mill effluent using powder and flake chitosan: Equilibrium and kinetic studies: *Water Research*, v. 39, p. 2483-2494.
- Aiba, S.-i., 1994, Preparation of *N*-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially *N*-acetylated chitosans: *Carbohydrate Research*, v. 261, p. 297-306.
- Allan, C. R., and L. A. Hadwiger, 1979, The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition: *Experimental Mycology*, v. 3, p. 285-287.
- Anas, A., S. Paul, N. S. Jayaprakash, R. Philip, and I. S. Bright Singh, 2005, Antimicrobial activity of chitosan against vibrios from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* larval rearing systems: *Diseases of aquatic organisms*, v. 67, p. 177-179.
- Anraku, M., T. Fujii, Y. Kondo, E. Kojima, T. Hata, N. Tabuchi, D. Tsuchiya, T. Goromaru, H. Tsutsumi, D. Kadowaki, T. Maruyama, M. Otagiri, and H. Tomida, 2011, Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan *in vitro* and *in vivo*: *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 501-505.
- Anthonsen, M. W., K. M. Vårum, A. M. Hermansson, O. Smidsrød, and D. A. Brant, 1994, Aggregates in acidic solutions of chitosans detected by static laser light scattering: *Carbohydrate Polymers*, v. 25, p. 13-23.
- Arai, K., T. Kinumaki, and T. Fujita, 1968, Toxicity of chitosan: *Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*, v. 56, p. 89-94.
- Aranaz, I., M. Mengibar, R. Harris, I. Panos, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, and A. Heras, 2009, Functional characterization of chitin and chitosan: *Current Chemical Biology*, v. 3, p. 203-230.
- Armstrong, J. J., J. Baddiley, and J. G. Buchanan, 1960, Structure of the ribitol teichoic acid from the walls of *Bacillus subtilis*: *Biochemical Journal*, v. 76, p. 610-621.
- Arora, A. S., P. de Groen, Y. Emori, and G. J. Gores, 1996, A cascade of degradative hydrolase activity contributes to hepatocyte necrosis during anoxia: *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 270, p. G238-G245.
- Best, D. J., and D. E. Roberts, 1975, Algorithm AS 89: The upper tail probabilities of Spearman's *Rho*: *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, v. 24, p. 377-379.
- BG BAU, 2011, Charakterisierung Grenzwerte und Einstufungen: Informationen der Berufsgenossenschaft der Bauwirtschaft.
- Bishop, Y. M. M., S. E. Fienberg, and P. W. Holland, 1978, Discrete multivariate analysis : Theory and practice, v. chapter 14.6: Cambridge Mass. and London England, M.I.T. Press.
- Biswas, R., R. E. Martinez, N. Göhring, M. Schlag, M. Josten, G. Xia, F. Hegler, C. Gekeler, A.-K. Gleske, F. Götz, H.-G. Sahl, A. Kappler, and A. Peschel, 2012, Proton-binding capacity of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid and its role in controlling autolysin activity: *PLOS ONE*, v. 7, p. e41415.

- Blackwell, J., 1969, Structure of β -chitin or parallel chain systems of poly- β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetyl-D-glucosamine: *Biopolymers*, v. 7, p. 281-298.
- Block, S. S., 1953, Humidity requirements for mold growth: *Applied Microbiology*, v. 1, p. 287-293.
- Boettcher, K. J., and E. G. Ruby, 1990, Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: *Journal of Bacteriology*, v. 172, p. 3701-3706.
- Breed, R. S., E. G. D. Murray, and N. R. Smith, 1957, *Bergey's manual of determinative bacteriology* (7th edn): Baltimore, Maryland, Williams and Wilkins Co.
- Brouwer, H., 1991, Testing for chemical toxicity using bacteria: An undergraduate laboratory experiment: *Journal of Chemical Education*, v. 68, p. 695.
- BVL, 2011, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Verzeichnis zugelassener Pflanzenschutzmittel, <https://portal.bvl.bund.de/psm/jsp/>, (Stand 10/06/2011).
- Cai, J., L. Zhang, S. Liu, Y. Liu, X. Xu, X. Chen, B. Chu, X. Guo, J. Xu, H. Cheng, C. C. Han, and S. Kuga, 2008, Dynamic self-assembly induced rapid dissolution of cellulose at low temperatures: *Macromolecules*, v. 41, p. 9345-9351.
- Campos, M., L. Cordi, N. Durán, and L. Mei, 2006, Antibacterial activity of chitosan solutions for wound dressing: *Macromolecular Symposia*, v. 245-246, p. 515-518.
- Carpenter, C. E., J. V. Smith, and J. R. Broadbent, 2011, Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition: *Meat Science*, v. 88, p. 256-260.
- Cervera, M. L., M. C. Arnal, and M. de la Guardia, 2003, Removal of heavy metals by using adsorption on alumina or chitosan: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 375, p. 820-825.
- Chatelet, C., O. Damour, and A. Domard, 2001, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films: *Biomaterials*, v. 22, p. 261-268.
- Chaussard, G., and A. Domard, 2004, New aspects of the extraction of chitin from squid pens: *Biomacromolecules*, v. 5, p. 559-564.
- Chen, C.-L., Y.-M. Wang, C.-F. Liu, and J.-Y. Wang, 2008, The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation: *Biomaterials*, v. 29, p. 2173-2182.
- Chen, Y.-M., Y.-C. Chung, L. Woan Wang, K.-T. Chen, and S.-Y. Li, 2002, Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen: *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 37, p. 1379-1390.
- Cheng, C. Y., and Y.-K. Li, 2000, An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides: *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 32, p. 197-203.
- Chung, Y.-C., and C.-Y. Chen, 2008, Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan: *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2806-2814.
- Chung, Y.-C., H.-L. Wang, Y.-M. Chen, and S.-L. Li, 2003, Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens: *Bioresource Technology*, v. 88, p. 179-184.
- Chung, Y. C., Y. P. Su, C. C. Chen, G. Jia, H. L. Wang, J. C. Wu, and J. G. Lin, 2004, Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall: *Acta pharmacologica Sinica*, v. 25, p. 932.
- Clark, G. L., and A. F. Smith, 1936, X-ray diffraction studies of chitin, chitosan, and derivatives: *The Journal of Physical Chemistry*, v. 40, p. 863-879.
- Conner, D. E., and J. S. Kotrola, 1995, Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 382-385.

- Costa, E. M., S. Silva, C. Pina, F. K. Tavaría, and M. M. Pintado, 2012, Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens: *Anaerobe*, v. 18, p. 305-309.
- Dambies, L., T. Vincent, A. Domard, and E. Guibal, 2001, Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation: *Biomacromolecules*, v. 2, p. 1198-1205.
- Daubs, E. H., 1965, A monograph of Lemnaceae: Illinois biological monographs, University of Illinois Press.
- Di Mario, F., P. Rapanà, U. Tomati, and E. Galli, 2008, Chitin and chitosan from Basidiomycetes: *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, p. 8-12.
- dieti-natura, 2015, der Spezialist für Nahrungsergänzungsmittel seit 1992, <http://www.dieti-natura.de>, (Stand 14.01.2015).
- Dodane, V., and V. D. Vilivalam, 1998, Pharmaceutical applications of chitosan: *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 1, p. 246-253.
- Domard, A., 1987, pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: Application to Cu^{II}-polymer interactions: *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 9, p. 98-104.
- Dörfelt, H., and H. Heklau, 1998, Die Geschichte der Mykologie: Auflage 1: Schwäbisch Gmünd, Einhorn-Verlag.
- Draper, N. R., and H. Smith, 1966, Applied regression analysis, 2nd edition: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, v. Kapitel 10.2: Estimating the parameters of a nonlinear system: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons.
- Dringen, R., L. Kussmaul, and B. Hamprecht, 1998, Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay: *Brain Research Protocols*, v. 2, p. 223-228.
- Du, Y., Y. Zhao, S. Dai, and B. Yang, 2009, Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity: *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 10, p. 103-107.
- Eberius, M., 2001, Observation parameters of the duckweed growth inhibition test: Frond number–total frond area–dry weight. LemnaTec, Woerselen, Germany.
- Erental, A., I. Sharon, and H. Engelberg-Kulka, 2012, Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: An apoptotic-like death is inhibited by the *mazEF*-mediated death pathway: *PLOS Biology*, v. 10, p. e1001281.
- Falcón-Rodríguez, A. B., D. Costales, J. C. Cabrera, and M. Á. Martínez-Téllez, 2011, Chitosan physico-chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the oomycete *Phytophthora nicotianae*: *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 100, p. 221-228.
- Feng, Y., and W. Xia, 2011, Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble *O*-fumaryl-chitosan: *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1169-1173.
- Foster, J. W., 2004, *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile: *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 898-907.
- Friedrich, T., and D. Scheide, 2000, The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases1: *FEBS Letters*, v. 479, p. 1-5.
- Frohlich, K. M., Z. Hua, A. J. Quayle, J. Wang, M. E. Lewis, C. W. Chou, M. Luo, L. R. Buckner, and L. Shen, 2014, Membrane vesicle production by *Chlamydia trachomatis* as an adaptive response: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 4 (73), p. 1-11.
- Fujiwara, M., Y. Hayashi, and N. Ohara, 2004, Inhibitory effect of water-soluble chitosan on growth of *Streptococcus mutans*: *The New Microbiologica*, v. 27, p. 83-86.

- Fukasawa, S., M. Arai, T. Wada, H. Shima, and M. Kurata, 1992, Some properties of a chitinase from a marine luminous bacterium, *Vibrio fischeri* strain COT-A136: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, p. 1631-1633.
- Gardner, K. H., and J. Blackwell, 1975, Refinement of the structure of β -chitin: *Biopolymers*, v. 14, p. 1581-1595.
- Genta, I., M. Costantini, A. Asti, B. Conti, and L. Montanari, 1998, Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres: *Carbohydrate Polymers*, v. 36, p. 81-88.
- Gerasimenko, D. V., I. D. Avdienko, G. E. Bannikova, O. Y. Zueva, and V. P. Varlamov, 2004, Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms: *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 40, p. 253-257.
- Gooday, G. W., 1994, Cell walls, in N. A. R. Gow, and G. M. Gadd, eds., *The growing fungus*: London, Chapman & Hall, p. 43-62.
- Goy, R. C., and O. B. G. Assis, 2014, Antimicrobial analysis of films processed from chitosan and N,N,N-trimethylchitosan: *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 31, p. 643-648.
- Guimarães, F. P., R. Aguiar, D. Karam, J. A. Oliveira, J. A. A. Silva, C. L. Santos, B. F. Sant'anna-Santos, and C. Lizieri-Santos, 2011, Potential of macrophytes for removing atrazine from aqueous solution: *Planta Daninha*, v. 29, p. 1137-1147.
- Haipeng, G., Z. Yinghui, L. Jianchun, G. Yandao, Z. Nanming, and Z. Xiufang, 2000, Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials: *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 52, p. 285-295.
- Hajmeer, M., E. Ceylan, J. L. Marsden, and D. Y. C. Fung, 2006, Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy: *Food Microbiology*, v. 23, p. 446-452.
- Harish Prashanth, K. V., and R. N. Tharanathan, 2007, Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview: *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 117-131.
- Harwood, C. R., 1989, *Bacillus* - biotechnology handbooks, v. 2: New York, London Plenum Press.
- Hasegawa, M., A. Isogai, and F. Onabe, 1993, Preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid: *Carbohydrate Polymers*, v. 20, p. 279-283.
- Hecker, M., C. Heim, U. Völker, and L. Wölfel, 1988, Induction of stress proteins by sodium chloride treatment in *Bacillus subtilis*: *Archives of Microbiology*, v. 150, p. 564-566.
- Helander, I. M., E. L. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, and S. Roller, 2001, Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria: *International Journal of Food Microbiology*, v. 71, p. 235-244.
- Hillman, W., 1961, The Lemnaceae, or duckweeds: *The Botanical Review*, v. 27, p. 221-287.
- Hirai, A., H. Odani, and A. Nakajima, 1991, Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy: *Polymer Bulletin*, v. 26, p. 87-94.
- Hirano, S., and Y. Noishiki, 1985, The blood compatibility of chitosan and *N*-acylchitosans: *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 19, p. 413-417.
- Horvat, T., Ž. Vidaković-Cifrek, V. Oreščanin, M. Tkalec, and B. Pevalek-Kozlina, 2007, Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L: *Science of The Total Environment*, v. 384, p. 229-238.
- Hosein, A. M., F. Breidt, and C. E. Smith, 2011, Modeling the effects of sodium chloride, acetic acid, and intracellular pH on survival of *Escherichia coli* O157:H7: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 889-895.
- Hou, W., X. Chen, G. Song, Q. Wang, and C. Chi Chang, 2007, Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*): *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 45, p. 62-69.

- Hung, T.-H., Y.-M. Chang, H.-Y. Sung, and C.-T. Chang, 2002, Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain: *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, p. 4666-4673.
- Huys, G., K. D'Haene, and J. Swings, 2002, Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method: *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, p. 402-406.
- Il'ina, A. V., and V. P. Varlamov, 2004, Hydrolysis of chitosan in lactic acid: *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 40, p. 300-303.
- Ito, Y., Y. Ochiai, Y. S. Park, and Y. Imanishi, 1997, pH-sensitive gating by conformational change of a polypeptide brush grafted onto a porous polymer membrane: *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, p. 1619-1623.
- Jang, M.-K., B.-G. Kong, Y.-I. Jeong, C. H. Lee, and J.-W. Nah, 2004, Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources: *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 42, p. 3423-3432.
- Je, J.-Y., and S.-K. Kim, 2006, Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 6629-6633.
- Jeon, Y.-J., P.-J. Park, and S.-K. Kim, 2001, Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor: *Carbohydrate Polymers*, v. 44, p. 71-76.
- Jia, Z., and D. Shen, 2002, Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid: *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p. 393-396.
- Jin, L., and R. Bai, 2002, Mechanisms of lead adsorption on chitosan/PVA hydrogel beads: *Langmuir*, v. 18, p. 9765-9770.
- Kadereit, J. W., 2002, *Evolution und Systematik, allgemeine Grundlagen*, Strasburger - Lehrbuch der Botanik 35. Auflage: Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, p. 604-646.
- Kadner, R. J., 1996, *Cytoplasmatic membrane, Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*: Washington DC, American Society for Microbiology Press, p. 58-87.
- Karakashev, D., D. Galabova, and I. Simeonov, 2003, A simple and rapid test for differentiation of aerobic from anaerobic bacteria: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 233-238.
- Kasaai, M. R., 2009, Various methods for determination of the degree of *N*-acetylation of chitin and chitosan: A review: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 1667-1676.
- Kato, Y., A. Yagami, and K. Matsunaga, 2005, A case of anaphylaxis caused by the health food chitosan: *Arerugi*, v. 54, p. 1427-1429.
- Kean, T., and M. Thanou, 2010, Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p. 3-11.
- Khan, W. M., B. Prithviraj, and D. L. Smith, 2002, Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean: *Photosynthetica*, v. 40, p. 621-624.
- Khellaf, N., and M. Zerdaoui, 2009, Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution: *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 6, p. 161-166.
- Khor, E., and L. Y. Lim, 2003, Implantable applications of chitin and chitosan: *Biomaterials*, v. 24, p. 2339-2349.
- Kingkaew, J., S. Kirdponpattara, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, and M. Phisalaphong, 2014, Effect of molecular weight of chitosan on antimicrobial properties and tissue compatibility of chitosan-impregnated bacterial cellulose films: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 19, p. 534-544.

- Knorr, D., 1982, Functional properties of chitin and chitosan: *Journal of Food Science*, v. 47, p. 593-595.
- Kochkina, Z. M., and S. N. Chirkov, 2000, Effect of chitosan derivatives on the reproduction of coliphages T2 and T7: *Microbiology*, v. 69, p. 208-211.
- Koenig, J. L., 1992, *Spectroscopy of polymers. An ACS professional reference book: Acta Polymerica*: Washington, DC, American Chemical Society.
- Kofuji, K., C.-J. Qian, M. Nishimura, I. Sugiyama, Y. Murata, and S. Kawashima, 2005, Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan: *European Polymer Journal*, v. 41, p. 2784-2791.
- Kong, M., X. G. Chen, K. Xing, and H. J. Park, 2010, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review: *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, p. 51-63.
- Korzeniewski, C., and D. M. Callewaert, 1983, An enzyme-release assay for natural cytotoxicity: *Journal of Immunological Methods*, v. 64, p. 313-320.
- Kracke, F., I. Vassilev, and J. O. Kromer, 2015, Microbial electron transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems: *Front Microbiology Journal*, v. 6, p. 575.
- Krupesha Sharma, S. R., K. M. Shankar, M. L. Sathyanarayana, R. Patil, H. D. Narayana Swamy, and S. Rao, 2011, Development of biofilm of *Vibrio alginolyticus* for oral immunostimulation of shrimp: *Aquaculture International*, v. 19, p. 421-430.
- Kulikov, S. N., S. N. Chirkov, A. V. Il'ina, S. A. Lopatin, and V. P. Varlamov, 2006, Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants: *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, p. 200-203.
- Kumar, M. N. V. R., R. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, and A. J. Domb, 2004, Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives: *Chemical reviews*, v. 104, p. 6017-6084.
- Kumirska, J., M. X. Weinhold, J. Thöming, and P. Stepnowski, 2011, Biomedical activity of chitin/chitosan based materials—influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of *N*-acetylation: *Polymers*, v. 3, p. 1875-1901.
- Kurita, K., 1998, Chemistry and application of chitin and chitosan: *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, p. 117-120.
- Kurita, K., M. Kamiya, and S.-I. Nishimura, 1991, Solubilization of a rigid polysaccharide: Controlled partial *N*-Acetylation of chitosan to develop solubility: *Carbohydrate Polymers*, v. 16, p. 83-92.
- Lacorn, M., G. Piechotta, T. J. Simat, U. Kammann, W. Wosniok, T. Lang, W. E. G. Müller, H. C. Schröder, H.-S. Jenke, and H. Steinhart, 2001, Annual cycles of apoptosis, DNA strand breaks, heat shock proteins, and metallothionein isoforms in dab (*Limanda limanda*): influences of natural factors and consequences for biological effect monitoring: *Biomarkers*, v. 6, p. 108-126.
- Landolt, E., 1986, *The family of Lemnaceae: a monographic study*, v. 1: Zürich, Geobotanisches Institut der ETH.
- Lange, 2011, *Leuchtbakterientest nach DIN EN ISO 11348 Teil 2 – Leuchtbakterientest LCK 482 Manual*.
- Lertworasirikul, A., S.-i. Tsue, K. Noguchi, K. Okuyama, and K. Ogawa, 2003, Two different molecular conformations found in chitosan type II salts: *Carbohydrate Research*, v. 338, p. 1229-1233.
- Lewis, K., 2001, Riddle of biofilm resistance: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 999-1007.
- Li, B., X. Wang, R. Chen, W. Huangfu, and G. Xie, 2008a, Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas pathogenic* bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*: *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 287-292.

- Li, L., and Y.-L. Hsieh, 2006, Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers: Carbohydrate Research, v. 341, p. 374-381.
- Li, Q., E. T. Dunn, E. W. Grandmaison, and M. F. A. Goosen, 1992, Applications and properties of chitosan: Journal of Bioactive and Compatible Polymers, v. 7, p. 370-397.
- Li, X.-f., X.-q. Feng, S. Yang, G.-q. Fu, T.-p. Wang, and Z.-x. Su, 2010, Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism: Carbohydrate Polymers, v. 79, p. 493-499.
- Li, X.-F., X.-Q. Feng, S. Yang, T.-P. Wang, and Z.-X. Su, 2008b, Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*: Iranian Polymer Journal, v. 17, p. 843-852.
- Lim, L.-Y., E. Khor, and O. Koo, 1998, γ irradiation of chitosan: Journal of Biomedical Materials Research, v. 43, p. 282-290.
- Lim, L.-Y., E. Khor, and C.-E. Ling, 1999, Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan: Journal of Biomedical Materials Research, v. 48, p. 111-116.
- Lin, S.-B., Y.-C. Lin, and H.-H. Chen, 2009, Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity: Food Chemistry, v. 116, p. 47-53.
- Lindqvist, R., and G. Barmark, 2014, Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to lactic acid stress: Implications for predictive microbiology: BioMed research international, v. 2014 (ID471317), p. 1-8.
- Liu, N., X.-G. Chen, H.-J. Park, C.-G. Liu, C.-S. Liu, X.-H. Meng, and L.-J. Yu, 2006, Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*: Carbohydrate Polymers, v. 64, p. 60-65.
- Liu, X.-M., L.-S. Wang, L. Wang, J. Huang, and C. He, 2004, The effect of salt and pH on the phase-transition behaviors of temperature-sensitive copolymers based on *N*-isopropylacrylamide: Biomaterials, v. 25, p. 5659-5666.
- Logesh, A. R., K. A. Thillaimaharani, K. Sharmila, M. Kalaiselvam, and S. M. Raffi, 2012, Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity: Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 2, p. 140-143.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker, 2001, Brock Mikrobiologie: Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Maeda, Y., and Y. Kimura, 2004, Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice: The Journal of Nutrition, v. 134, p. 945-950.
- Mariscal, A., R. Lopez-Gigosos, M. Carnero-Varo, and J. Fernandez-Crehuet, 2009, Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm: Applied Microbiology and Biotechnology, v. 82, p. 773-783.
- Marreco, P. R., P. d. L. Moreira, S. C. Genari, and Â. M. Moraes, 2004, Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings: Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v. 71B, p. 268-277.
- Mellegård, H., S. P. Strand, B. E. Christensen, P. E. Granum, and S. P. Hardy, 2011, Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism: International Journal of Food Microbiology, v. 148, p. 48-54.
- Minke, R., and J. Blackwell, 1978, The structure of α -chitin: Journal of Molecular Biology, v. 120, p. 167-181.

- Mondal, M. M. A., M. A. Malek, A. B. Puteh, and M. R. Ismail, 2013, Foliar application of chitosan on growth and yield attributes of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek): Bangladesh Journal of Botany; Vol 42, No 1, p. 179-183.
- Mondal, M. M. A., M. A. Malek, A. B. Puteh, M. R. Ismail, and M. Ashrafuzzaman, 2012, Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra: Australian Journal of Crop Science, v. 6, p. 918-921.
- Montejano, H. A., M. Gervaldo, and S. G. Bertolotti, 2005, The excited-states quenching of resazurin and resorufin by *p*-benzoquinones in polar solvents: Dyes and Pigments, v. 64, p. 117-124.
- Muzzarelli, R., R. Tarsi, O. Filippini, E. Giovanetti, G. Biagini, and P. E. Varaldo, 1990, Antimicrobial properties of *N*-carboxybutyl chitosan: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 34, p. 2019-2023.
- Muzzarelli, R. A. A., 1973, Natural chelating polymers : Alginate acid, chitin and chitosan: International series of monographs in analytical chemistry; vol. 55: Oxford [etc.], [s.n.].
- Nemtsev, S. V., O. Y. Zueva, M. R. Khismatullin, A. I. Albulov, and V. P. Varlamov, 2004, Isolation of chitin and chitosan from honeybees: Applied Biochemistry and Microbiology, v. 40, p. 39-43.
- Neumann-Hensel, H., and K. Melbye, 2006, Optimisation of the solid-contact test with *Arthrobacter globiformis*: Journal of Soils and Sediments, v. 6, p. 201-207.
- Nge, K. L., N. Nwe, S. Chandkrachang, and W. F. Stevens, 2006, Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture: Plant Science, v. 170, p. 1185-1190.
- Nguyen, T. T. B., S. Hein, C.-H. Ng, and W. F. Stevens, 2008, Molecular stability of chitosan in acid solutions stored at various conditions: Journal of Applied Polymer Science, v. 107, p. 2588-2593.
- Nikaido, H., 1996, Outer membrane, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, American Society for Microbiology Press, p. 29-47.
- Nikaido, H., and E. Y. Rosenberg, 1981, Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of *Escherichia coli*: The Journal of General Physiology, v. 77, p. 121-135.
- No, H. K., K. S. Lee, and S. P. Meyers, 2000, Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of chitosan products: Journal of Food Science, v. 65, p. 1134-1137.
- No, H. K., N. Young Park, S. Ho Lee, and S. P. Meyers, 2002, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights: International Journal of Food Microbiology, v. 74, p. 65-72.
- OECD, 2006, Organisation for Economic Co-operation and Development; Test No. 221: *Lemna* sp. growth inhibition test, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264016194-en>.
- Ogawa, K., T. Yui, and K. Okuyama, 2004, Three D structures of chitosan: International Journal of Biological Macromolecules, v. 34, p. 1-8.
- Okamoto, Y., M. Watanabe, K. Miyatake, M. Morimoto, Y. Shigemasa, and S. Minami, 2002, Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium: Biomaterials, v. 23, p. 1975-1979.
- Okuyama, K., K. Noguchi, Y. Hanafusa, K. Osawa, and K. Ogawa, 1999, Structural study of anhydrous tendon chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex: International Journal of Biological Macromolecules, v. 26, p. 285-293.
- Okuyama, K., K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, and K. Ogawa, 2000, Structural diversity of chitosan and its complexes: Carbohydrate Polymers, v. 41, p. 237-247.

- Okuyama, K., K. Noguchi, T. Miyazawa, T. Yui, and K. Ogawa, 1997, Molecular and crystal structure of hydrated chitosan: *Macromolecules*, v. 30, p. 5849-5855.
- Oliver, D. B., 1996, Periplasm, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology: Washington DC, American Society for Microbiology Press, p. 88-103.
- Omumasaba, C. A., N. Yoshida, Y. Sekiguchi, K. Kariya, and K. Ogawa, 2000, Purification and some properties of a novel chitosanase from *Bacillus subtilis* KH1: *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 46, p. 19-27.
- Ondruschka, J., M. Trutnau, and T. Bley, 2008, Gewinnung und potenzielle des biopolymers chitosan: *Chemie Ingenieur Technik*, v. 80, p. 811-820.
- Onsoyten, E., and O. Skaugrud, 1990, Metal recovery using chitosan: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 49, p. 395-404.
- Pan, C., H. Rezaei, and A. Soo, 2011, Chitosan disrupts membrane permeability of lactic acid bacteria: *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, v. 15, p. 7-14.
- Park, S. H., J.-H. Lee, and H. K. Lee, 2000, Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio sp.* 98CJ11027: *The Journal of Microbiology*, v. 38, p. 224-229.
- Pathak, S., and V. S. Chauhan, 2011, Rationale-based, *de novo* design of dehydrophenylalanine-containing antibiotic peptides and systematic modification in sequence for enhanced potency: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 2178-2188.
- Percot, A., C. Viton, and A. Domard, 2003, Optimization of chitin extraction from shrimp shells: *Biomacromolecules*, v. 4, p. 12-18.
- Philippova, O. E., E. V. Korchagina, E. V. Volkov, V. A. Smirnov, A. R. Khokhlov, and M. Rinaudo, 2012, Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: Role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker: *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 687-694.
- Pinheiro, J. C., and D. M. Bates, 2000, *Mixed-effects models in S and S-PLUS*, Springer Science & Business Media.
- Pochanavanich, P., and W. Suntornsuk, 2002, Fungal chitosan production and its characterization: *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p. 17-21.
- Pospieszny, H., and J. G. Atabekov, 1989, Effect of chitosan on the hypersensitive reaction of bean to alfalfa mosaic virus: *Plant Science*, v. 62, p. 29-31.
- Pospieszny, H., S. Chirkov, and J. Atabekov, 1991, Induction of antiviral resistance in plants by chitosan: *Plant Science*, v. 79, p. 63-68.
- Prabaharan, M., and J. F. Mano, 2005, Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems: *Drug Delivery*, v. 12, p. 41-57.
- Qun, G., and W. Ajun, 2006, Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution: *Carbohydrate Polymers*, v. 64, p. 29-36.
- R Core Team, 2013, *R: A language and environment for statistical computing*: R Foundation for Statistical Computing, v. Vienna, Austria.
- Raafat, D., K. von Barga, A. Haas, and H.-G. Sahl, 2008, Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 3764-3773.
- Rabea, E. I., M. E. I. Badawy, T. M. Rogge, C. V. Stevens, M. Höfte, W. Steurbaut, and G. Smagghe, 2005, Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives: *Pest Management Science*, v. 61, p. 951-960.
- Rabea, E. I., M. E. T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut, 2003, Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action: *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1457-1465.

- Ramos, V. M., N. M. Rodríguez, M. F. Díaz, M. S. Rodríguez, A. Heras, and E. Agulló, 2003, *N*-methylene phosphonic chitosan. Effect of preparation methods on its properties: *Carbohydrate Polymers*, v. 52, p. 39-46.
- Rao, S. B., and C. P. Sharma, 1995, Sterilization of chitosan: Implications: *Journal of Biomaterials Applications*, v. 10, p. 136-143.
- Reisner, A., J. A. J. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner, and S. Molin, 2003, Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms: *Molecular Microbiology*, v. 48, p. 933-946.
- Richardson, S. W., H. J. Kolbe, and R. Duncan, 1999, Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: Biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA: *International Journal of Pharmaceutics*, v. 178, p. 231-243.
- Rinaudo, M., 2006, Chitin and chitosan: Properties and applications: *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603-632.
- Rinaudo, M., G. Pavlov, and J. Desbrières, 1999, Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan: *Polymer*, v. 40, p. 7029-7032.
- Risbud, M., M. Endres, J. Ringe, R. Bhonde, and M. Sittinger, 2001, Biocompatible hydrogel supports the growth of respiratory epithelial cells: Possibilities in tracheal tissue engineering: *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 56, p. 120-127.
- Roberts, G. A. F., 1992, *Chitin chemistry*: London, Macmillan Press Ltd. .
- Roberts, G. A. F., 2007, The road is long *Advances in chitin science*, 8th International Conference of the European Chitin Society EUCHIS'07, Antalya, Turkey, p. 03-10.
- Roberts, G. A. F., and J. G. Domszy, 1982, Determination of the viscometric constants for chitosan: *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 4, p. 374-377.
- Robles-Martínez, L., M. G. Guerra-Sánchez, A. N. Hernández-Lauzardo, J. P. Pardo, and M. G. Velázquez-del Valle, 2014, Effects of chitosan and oligochitosan on development and mitochondrial function of *Rhizopus stolonifer*: *Journal of Basic Microbiology*, v. 54, p. S42-S49.
- Roby, D., A. Gadelle, and A. Toppan, 1987, Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 143, p. 885-892.
- Rudall, K. M., 1963, The chitin/protein complexes of insect cuticles: *Advances in insect physiology*, v. 1, p. 257-313.
- Salton, M. R. J., 1963, The relationship between the nature of the cell wall and the gram stain: *Journal of General Microbiology*, v. 30, p. 223-235.
- Salton, M. R. J., and K. Kwang-Shin, 1996, *Structure*, in S. Baron, ed., *Medical microbiology*: Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Samson, R. A., P. Noonim, M. Meijer, J. Houbraken, J. C. Frisvad, and J. Varga, 2007, Diagnostic tools to identify black aspergilli: *Studies in Mycology*, v. 59, p. 129-145.
- Santhanam, M. S., 1955, *Studies on cuticles of Arthropods*: *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, v. 42, p. 142-151.
- Sauermost, R., and D. Freudig, 1999, *Lexikon der Biologie*, Spektrum.de, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/> (Stand 24.11.2015).
- Schatz, C., C. Viton, T. Delair, C. Pichot, and A. Domard, 2003, Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution: *Biomacromolecules*, v. 4, p. 641-648.
- Schnabel, R. B., J. E. Koonatz, and B. E. Weiss, 1985, A modular system of algorithms for unconstrained minimization: *Association for Computing Machinery Transactions on Mathematical Software*, v. 11, p. 419-440.

- Seyfarth, F., S. Schliemann, P. Elsner, and U. C. Hipler, 2008, Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and *N*-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*: *International Journal of Pharmaceutics*, v. 353, p. 139-148.
- Shrestha, A., S. Zhilong, N. K. Gee, and A. Kishen, 2010, Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity: *Journal of Endodontics*, v. 36, p. 1030-1035.
- Šimůnek, J., G. Tishchenko, B. Hodrová, and H. Bartoňová, 2006, Effect of chitosan on the growth of human colonic bacteria: *Folia Microbiologica*, v. 51, p. 306-308.
- Singla, A. K., and M. Chawla, 2001, Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p. 1047-1067.
- Sorlier, P., A. Denuzière, C. Viton, and A. Domard, 2001, Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan: *Biomacromolecules*, v. 2, p. 765-772.
- Sorlier, P., C. Viton, and A. Domard, 2002, Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: Role of aging: *Biomacromolecules*, v. 3, p. 1336-1342.
- Strand, S. P., K. M. Vårum, and K. Østgaard, 2003, Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 27, p. 71-81.
- Sudarshan, N. R., D. G. Hoover, and D. Knorr, 1992, Antibacterial action of chitosan: *Food Biotechnology*, v. 6, p. 257-272.
- Tanaka, M., J. R. Huang, W. K. Chiu, S. Ishizaki, and T. Taguchi, 1993, Effect of the Maillard reaction on functional properties of chitosan: *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, v. 59, p. 1915-1921.
- Tømmeraaas, K., S. P. Strand, B. E. Christensen, O. Smidsrød, and K. M. Vårum, 2011, Preparation and characterization of branched chitosans: *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1558-1564.
- TrinkwV, 1990, Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (TrinkwV vom 05.12.1990), *Bundesgesetzblatt (BGBl) I*.
- TrinkwV, 2001, Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001), *Bundesgesetzblatt (BGBl) I*.
- Tsai, G.-J., and W.-H. Su, 1999, Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*: *Journal of Food Protection*, v. 62, p. 239-243.
- Tsai, G.-J., W.-H. Su, H.-C. Chen, and C.-L. Pan, 2002, Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation: *Fisheries Science*, v. 68, p. 170-177.
- Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis, 2000, Chitin deacetylases: New, versatile tools in biotechnology: *Trends in Biotechnology*, v. 18, p. 305-312.
- Uchida, Y., M. Izume, and A. Ohtakara, 1989 Purification and enzymatic properties of chitosanase from *Bacillus sp.* no. 7-M: *Bulletin of the faculty of agriculture Saga University*, p. 105-116.
- Ueno, H., T. Mori, and T. Fujinaga, 2001, Topical formulations and wound healing applications of chitosan: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 52, p. 105-115.
- Urbanczyk, H., J. C. Ast, M. J. Higgins, J. Carson, and P. V. Dunlap, 2007, Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov.: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 2823-2829.

- van Ewijk, P. H., and J. A. Hoekstra, 1993, Calculation of the EC50 and Its Confidence Interval When Subtoxic Stimulus Is Present: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 25, p. 25-32.
- Vander, P., K. M. Vårum, A. Domard, N. Eddine El Gueddari, and B. M. Moerschbacher, 1998, Comparison of the ability of partially *N*-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves: *Plant Physiology*, v. 118, p. 1353-1359.
- Vårum, K. M., M. W. Anthonsen, H. Grasdalen, and O. Smidsrød, 1991a, ¹³C-N.m.r. studies of the acetylation sequences in partially *N*-deacetylated chitins (chitosans): *Carbohydrate Research*, v. 217, p. 19-27.
- Vårum, K. M., M. W. Antohonsen, H. Grasdalen, and O. Smidsrød, 1991b, Determination of the degree of *N*-acetylation and the distribution of *N*-acetyl groups in partially *N*-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy: *Carbohydrate Research*, v. 211, p. 17-23.
- Vårum, K. M., M. M. Myhr, R. J. N. Hjerde, and O. Smidsrød, 1997, *In vitro* degradation rates of partially *N*-acetylated chitosans in human serum: *Carbohydrate Research*, v. 299, p. 99-101.
- Vasyukova, N. I., S. V. Zinov'eva, L. I. Il'inskaya, E. A. Perekhod, G. I. Chalenko, N. G. Gerasimova, A. V. Il'ina, V. P. Varlamov, and O. L. Ozeretskovskaya, 2001, Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan: *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 37, p. 103-109.
- Vert, M., Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, and F. Schué, 2012, Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012): *Pure and Applied Chemistry*, v. 84, p. 377-410.
- Völker, U., S. Engelmann, B. Maul, S. Riethdorf, A. Völker, R. Schmid, H. Mach, and M. Hecker, 1994, Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*: *Microbiology*, v. 140, p. 741-752.
- Vollmer, W., D. Blanot, and M. A. De Pedro, 2008, Peptidoglycan structure and architecture: *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, p. 149-167.
- Wang, G.-H., 1992, Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan: *Journal of Food Protection*, v. 55, p. 916-919.
- Wang, S.-L., S.-J. Chen, and C.-L. Wang, 2008, Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas sp.* TKU015 using shrimp shells as a substrate: *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 1171-1179.
- Wang, W., 1986, Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed: *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, v. 11, p. 1-14.
- Wang, X., J. Ma, Y. Wang, and B. He, 2002, Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements: *Biomaterials*, v. 23, p. 4167-4176.
- Wang, X. H., D. P. Li, W. J. Wang, Q. L. Feng, F. Z. Cui, Y. X. Xu, X. H. Song, and M. van der Werf, 2003, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers: *Biomaterials*, v. 24, p. 3213-3220.
- Wang, Y., E. Y. Chi, K. S. Schanze, and D. G. Whitten, 2012, Membrane activity of antimicrobial phenylene ethynylene based polymers and oligomers: *Soft Matter*, v. 8, p. 8547-8558.
- Warth, A. D., and J. L. Strominger, 1971, Structure of the peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*: *Biochemistry*, v. 10, p. 4349-4358.
- Wasikiewicz, J. M., F. Yoshii, N. Nagasawa, R. A. Wach, and H. Mitomo, 2005, Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods: *Radiation Physics and Chemistry*, v. 73, p. 287-295.

- Webster, J. R., and E. F. Benfield, 1986, Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems: Annual review of ecology and systematics, p. 567-594.
- Wedmore, I., J. G. McManus, A. E. Pusateri, and J. B. Holcomb, 2006, A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: Experience in current combat operations: Journal of Trauma and Acute Care Surgery, v. 60, p. 655-658.
- Weinhold, M. X., J. C. M. Sauvageau, N. Keddig, M. Matzke, B. Tartsch, I. Grunwald, C. Kübel, B. Jastorff, and J. Thöming, 2009, Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis, v. 11, p. 498-509.
- Winfield, M. D., and E. A. Groisman, 2003, Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*: Applied and Environmental Microbiology, v. 69, p. 3687-3694.
- World Health Organisation, 2004, Uranium in drinking-water WHO Guidelines for Drinking-water Quality, v. 3.
- Xia, W., P. Liu, J. Zhang, and J. Chen, 2011, Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides: Food Hydrocolloids, v. 25, p. 170-179.
- Yoon, K.-Y., J. Hoon Byeon, J.-H. Park, and J. Hwang, 2007, Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles: Science of The Total Environment, v. 373, p. 572-575.
- Yui, T., K. Imada, K. Okuyama, Y. Obata, K. Suzuki, and K. Ogawa, 1994, Molecular and crystal structure of the anhydrous form of chitosan: Macromolecules, v. 27, p. 7601-7605.
- Zeng, L., C. Qin, G. He, W. Wang, W. Li, and D. Xu, 2008, Effect of dietary chitosans on trace iron, copper and zinc in mice: Carbohydrate Polymers, v. 74, p. 279-282.
- Zhang, J., X. G. Chen, G. Z. Sun, L. Huang, and X. J. Cheng, 2010, Effect of molecular weight on the oleoyl-chitosan nanoparticles as carriers for doxorubicin: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 77, p. 125-130.
- Zhang, M., A. Haga, H. Sekiguchi, and S. Hirano, 2000, Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia: International Journal of Biological Macromolecules, v. 27, p. 99-105.
- Zheng, L.-Y., and J.-F. Zhu, 2003, Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights: Carbohydrate Polymers, v. 54, p. 527-530.

Herstellerangaben

Apparaturen, Instrumente und Software

| | |
|---|--|
| 0.2 µm Flaschenaufsatzfilter | Sarstedt |
| 0.2 µm Spritzenvorsatzfilter Minisart RC 25 | Sartorius Stedim Biotech |
| 0.45 µm Cellulose Nitrat Filter | Sartorius |
| 0.8/0.2 µm Acrodisc PF Spritzenvorsatzfilter | PALL Life Sciences |
| 24-Well Suspensionskulturplatte | Greiner Bio-One |
| 24-Well Zellkulturplatte | Sarstedt |
| 25 ml Zellkulturflaschen | Corning Incorporated |
| 25 ml Zellkulturflaschen Nunclon Surface | Nunc |
| 6-Well Mikrotiterplatte | Greiner Bio-One |
| 96-Well Mikrotiterplatte | Sarstedt |
| 96-Well Titerplatte | Corning Incorporated |
| Agaroseplatte | Sarstedt |
| BEEM-Kapseln | Plano |
| Binokular Olympus SZX12 | Olympus optical corporation |
| Brutschrank 2771 | Köttermann Systemlabor |
| Brutschrank Function Line | Heraeus Instruments |
| Dual Action Shaker SH 20L | Polyscience |
| Eppendorf Zentrifuge 5415 | Eppendorf |
| Gaschromatographen von Chrompack | Varian |
| Glasobjektträger | Menzel-Gläser |
| Indikatorstäbchen | Machery-Nagel |
| Indikatorstäbchen | Merck |
| Indikatorstäbchen | Riedel-de-Haën |
| Inkubationsschüttler TH 15 | Edmund Bühler |
| Laborfuge 400 R Funktion Line | Heraeus Instruments |
| Lemna Tec Scanalyser | LemnaTec |
| Luminometers LUMISTox 300 | Dr. Bruno Lange |
| Lyophilisator Alpha 1-2 | Christ Gefriertrocknungsanlagen |
| Mikro-pH-Elektrode HI 1083 D | Hanna Instruments |
| MRX Revelation Microplate Reader | Dynatech Laboratories |
| Optima Wax Säule mit 0.25 µm ID | Macherey Nagel |
| Pflanzenzuchtkammer Fitotron SGC 970 | Sanyo Gallenkamp PLC |
| Planlux electronic Luxmeter | Gossen |
| R 2.13.0 | R Foundation for Statistical Computing |
| Revelation 4.22 | Dynex Technologies |
| Rotator | Agar Scientific |
| SANOclav | Adolf Wolf |
| Schüttelinkubator 3031 | GFL |
| Schüttler KS 125 basic | IKA Labortechnik |
| Spektrophotometer UV Mini 1240 | Shimadzu Scientific Instruments |
| Tecnaï F20 S-Twin Transmissions- elektronenmikroskop | FEI |
| Thermoblock LUMIStherm | Dr. Bruno Lange |
| Thoma-Zählkammer | Brand |
| Trockenschrank WTC | BINDER |
| Trocknungsschrank U10 | Memmert |
| Überkopfschüttler RA 20 | Gerhardt Analytical Systems |
| UV-Entkeimungsschrank | Ernst Schütt |
| Verbandswatte | Lohmann & Rauscher |
| Wallac Victor 1420 Multilabel Counter | PerkinElmer |
| Wallac Victor ² 1420 Multilabel Counter | PerkinElmer |

Wasserbad W 350 t
Wasserschüttelbad
Zählkammer
Zentrifuge 400 R

Memmert
Bioblock Scientific
Fuchs Rosenthal
Heraeus Instruments

Chemikalien

| | |
|---|------------------------------|
| 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) | Carl Roth |
| Adenosin-5-triphosphat-Dinatriumsalz (ATP) | Roche |
| alpha-D(+)-Glucose | Acrös organics |
| Ammoniumacetat | Riedel-de-Haën |
| Amoniumnitrat | Riedel-de-Haën |
| Borsäure | Acrös organics |
| Brenztraubensäure-Kaliumsalz | BioChemika |
| Brenztraubensäure-Natriumsalz | Serva |
| Cacodylsäure-Natriumsalz-Tetrahydrat | Serva |
| Calciumchlorid-Dihydrat | Chimica |
| Calciumnitrate-Tetrahydrate | Fluka |
| D-(+)-Glucosaminhydrochlorid | Sigma |
| Dipropylenglycoldiglycidylether (D.E.R. 736) | Serva |
| Dikaliumhydrogenphosphat | Riedel-de-Haën |
| Dimethylaminoethanol (DMAE) | Serva |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck |
| Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat | Fluka |
| Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat | Merck |
| Vinylcyclohexendiepoxyd (ERL 4206) | Electron Microscopy Sciences |
| Essigsäure | Fluka |
| Ethanol | Kottkamp |
| Glutaraldehyd | Serva |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Acrös organics |
| Kaliumchlorid | Fluka |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck |
| Kaliumhydroxid | Carl Roth |
| Kaliumnitrat | Fluka |
| L-Glutamin | PAA |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | Fluka |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | Fluka |
| Maleinsäure | Serva |
| Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat | Riedel-de-Haën |
| Mangan(II)-sulfat-Tetrahydrat | Merck |
| N-acetyl-D-Glucosamin | Sigma |
| Natriumacetat | Merck |
| Natriumchlorid | Fluka |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck |
| Natriumhydroxid | Merck |
| Natriummolybdat-Dihydrat | Sigma |
| Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) | Roche |
| Nonenylsuccininanhydrit (NSA) | Electron Microscopy Sciences |
| Osmiumtetroxid | Serva |
| Paraformaldehyd | Serva |
| Reynolds Bleicitrat-3-hydrat | Merck |
| Resazurin-Natriumsalz | Sigma-Aldrich |
| Salzsäure | Fluka |
| Titriplex III (EDTA) | Merck |
| Triethanolaminhydrochlorid (TEA) | Merck |

| | |
|--|-------|
| Triton X-100 | Fluka |
| Trizma®base (Tris) | Sigma |
| Uranylacetat-dihydrat | Merck |
| WST-1 Reagenz: (4-[3-(4-Jodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzol-Disulfonat) | Roche |
| Zinksulfat-Heptahydrat | Fluka |

Enzyme, Antibiotika, Seren, Extrakte, Puffer

| | |
|---|---|
| Acetatkinase von <i>Escherichia coli</i> | Roche |
| Bacto Agar | BD |
| Bacto Hefeextrakt | BD |
| Bacto Trypton | BD |
| BBL Muller Hinton II broth, cation-adjusted | BD |
| Fleischextrakt | Fluka |
| Fötale Kälberserum | Invitrogen Life Technologies |
| Lactatdehydrogenase | Roche |
| Penicillin/Streptomycin | PAA |
| Pepton | Carl Roth |
| Pferdeserum | PAA |
| Phosphatpuffer | Invitrogen Life Technologies Roswell Park |
| Memorial Institute-Medium (RPMI) | Invitrogen Life Technologies |
| Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel | Sigma |
| Reaktivierungslösung LCK 482 | HACH Lange |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abb. 1: Chemische Struktur der Monomereinheiten des Chitosans | 12 |
| Abb. 2: Kettenstruktur von Chitin und Chitosan..... | 13 |
| Abb. 3: Strukturen und Kettenanordnung von α -, β - und γ -Chitin..... | 14 |
| Abb. 4: Chitosanformen mit inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen..... | 16 |
| Abb. 5: Eigenschaften und Anwendungsgebiete für Chitin und Chitosan..... | 27 |
| Abb. 6: Schema der pilzlichen Zellwand der Zygomyceten | 31 |
| Abb. 7: Aufbau der Zellwand grampositiver und gramnegativer Bakterien..... | 33 |
| Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns | 40 |
| Abb. 9: Titerplatte des Proliferationsassays | 51 |
| Abb. 10: Veränderung des Molekulargewichts durch variierende Lagertemperaturen | 67 |
| Abb. 11: Veränderung von F_A , M_W und $[\eta]$ durch verschiedene Sterilisationsmethoden | 69 |
| Abb. 12: Retentionsvolumen einer fraktioniert sterilisierten Chitosanprobe..... | 70 |
| Abb. 13: Schimmelpilzbewuchs chitosanbehandelter Objektträger | 75 |
| Abb. 14: Proliferationsverlauf über 72 Stunden unter Einfluss von Chitosanen | 77 |
| Abb. 15: Proliferationsverlauf über 72 Stunden bei Monomeren und Substanzkontrollen | 78 |
| Abb. 16: Verlauf der EC-Werte im Proliferationsassay..... | 80 |
| Abb. 17: EC-Werte der Chitosane im Proliferationsassay nach 48 h | 81 |
| Abb. 18: EC-Werte der Monomere und Substanzkontrollen | 82 |
| Abb. 19: Zeitabhängige Deformation chitosanbehandelter <i>E. coli</i> Bakterien..... | 84 |
| Abb. 20: Aggregatbildung mit steigender Chitosankonzentration..... | 85 |
| Abb. 21: Konzentrations- und zeitabhängige Deformation von <i>E. coli</i> Bakterien | 86 |
| Abb. 22: Dehydrogenaseaktivität von <i>E. coli</i> unter Einfluss von Chitosan..... | 88 |
| Abb. 23: Wirkung der Chitosane auf die Dehydrogenase von <i>E. coli</i> | 89 |
| Abb. 24: Dehydrogenaseaktivität durch Substanzkontrollen oder Monomere bei <i>E. coli</i> | 89 |
| Abb. 25: Dehydrogenaseaktivität von <i>B. subtilis</i> unter Einfluss von Chitosan | 91 |
| Abb. 26: Wirkung der Chitosane auf die Dehydrogenaseaktivität von <i>B. subtilis</i> | 92 |
| Abb. 27: Dehydrogenaseaktivität der Kontrollen bei <i>B. subtilis</i> | 93 |
| Abb. 28: Veränderung der Leuchtleistung durch Chitosane bei <i>V. fischeri</i> | 95 |
| Abb. 29: Schätzung des Kurvenverlaufs von Chitosan B [0.02] | 96 |
| Abb. 30: Änderung der Leuchtleistung bei <i>V. fischeri</i> | 96 |
| Abb. 31: EC-Werte der bakteriellen Testsysteme gruppiert nach Testsystemen..... | 98 |
| Abb. 32: EC-Werte der bakteriellen Testsysteme gruppiert nach Chitosanen..... | 100 |
| Abb. 33: Veränderung der Arealdominanz von <i>L. minor</i> unter Chitosan-Einfluss..... | 102 |
| Abb. 34: Einfluss der Monomere und Substanzkontrollen auf das Flächenwachstum | 103 |
| Abb. 35: Chitosan A [0.08] induzierte morphologische Veränderungen bei <i>L. minor</i> | 104 |
| Abb. 36: Chitosan B [0.02] induzierte morphologische Veränderungen bei <i>L. minor</i> | 104 |
| Abb. 37: Chitosan D [0.13] induzierte morphologische Veränderungen bei <i>L. minor</i> | 105 |
| Abb. 38: Morphologische Veränderungen von <i>L. minor</i> nach vier Wochen | 106 |
| Abb. 39: Variation des Wachstums über 4 Wochen unter Einfluss von Chitosan A [0.08] .. | 108 |
| Abb. 40: Variation des Wachstums über 4 Wochen unter Einfluss von Chitosan B [0.02] .. | 109 |
| Abb. 41: Variation des Wachstums über 4 Wochen unter Einfluss von Chitosan D [0.13] .. | 109 |
| Abb. 42: LDH-Gehalte behandelter Hep G2-Zellen | 111 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: Zelllinie | 46 |
| Tab. 2: Bakterien | 47 |
| Tab. 3: Schimmelpilze..... | 47 |
| Tab. 4: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Chitosane | 71 |
| Tab. 5: Chitosane vor der standardisierten Löslichkeitsbehandlung..... | 71 |
| Tab. 6: Chitosane nach der standardisierten Löslichkeitsbehandlung | 72 |
| Tab. 7: Charakteristika der Monomere und Substanzkontrollen..... | 73 |
| Tab. 8: Schwermetallbelastung der Chitosane A [0.08], B [0.02] und D [0.13]..... | 73 |
| Tab. 9: Numerische Bewertung des Hemmtests mit Schimmelpilzen | 74 |
| Tab. 10: EC-Werte der Chitosane nach 48 Stunden im Proliferationsassay | 82 |
| Tab. 11: EC-Werte der Chitosane im Dehydrogenase Assay mit <i>E. coli</i> | 88 |
| Tab. 12: EC-Werte der Chitosane im Dehydrogenase Assay mit <i>B. subtilis</i> | 93 |
| Tab. 13: Korrelationen bei <i>B. subtilis</i> | 93 |
| Tab. 14: EC-Werte bezogenen auf die Leuchtleistung | 97 |
| Tab. 15: EC ₅₀ -Werte der bakteriellen Testsysteme | 99 |
| Tab. 16: EC-Werte des Flächenwachstums von <i>L. minor</i> | 101 |

Anhang

Der Anhang wurde in digitaler Form der vorliegenden Arbeit beigelegt.

- 01 Untersuchungen zur Lagerung
- 02 Untersuchungen zur Sterilisation
- 03 Chitosanparameter
- 04 Proliferationsassay
- 05 Dehydrogenaseaktivität Ecoli
- 06 Dehydrogenaseaktivität Bsubtilis
- 07 Lumineszenz Vfischeri
- 08 Arealdominanz Lminor
- 09 Lminor RD
- 10 Hep G2