

# Nachweis der antibakteriellen Aktivität von Chitosan

## Detection of the antibacterial activity of chitosan

### Abstract

Using three bacterial strains the antibacterial activity of Chitoskin<sup>®</sup>, a chitosan-containing wound-dressing, was investigated by determining the viable bacterial cell count in liquid cultures in the absence and presence of Chitoskin<sup>®</sup>. Results were compared to those obtained for cellulose and silver-laminated cellulose.

While the pure cellulose wound-dressing had no impact on the bacterial growth, Chitoskin<sup>®</sup> and, to an even greater extend, silver-laminated cellulose reduced the viable cell count over 4,5 hrs. Adding a second sample after 2 hrs of incubation resulted in a significantly increased activity of Chitoskin<sup>®</sup>. In the presence of protein the activity of the silver-laminated cellulose was completely abolished, while that of Chitoskin<sup>®</sup> continued for at least 3 hrs.

Covering bacterial cells on an agar plate with Chitoskin<sup>®</sup> reversibly inhibited their growth, but did not kill them. Instead, they could be transferred to another sterile agar plate.

The results are compatible with the hypothesis that Chitoskin<sup>®</sup> shows a bacteriostatic activity due to its ability to strongly adsorb the cells. From the theoretical point of view, heavily contaminated wounds would benefit from an early renewal of the wound dressing.

**Keywords:** chitosan, antibacterial activity, wound-dressing

### Zusammenfassung

Chitosan ist ein polykationisches Chitinderivat, das in schwachen Säuren gelöst einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von Bakterien und Pilzen zeigt. Um derartige Effekte auch nachzuweisen, wenn es als Bestandteil von Wundauflagen wie Chitoskin<sup>®</sup> verwendet wird, wurde ein In-vitro-Test auf antibakterielle Aktivität mit drei Bakterienstämmen durchgeführt.

Dazu wurde die Anzahl vermehrungsfähiger Bakterien in einem flüssigen Nährmedium in An- und Abwesenheit von Chitoskin<sup>®</sup> im Vergleich zu Auflagen aus Cellulose und silberbeschichteter Cellulose über mehrere Stunden verfolgt.

Während das Wachstum eines *Staphylococcus aureus*-Stamms durch reine Cellulose nicht und durch Chitoskin<sup>®</sup> nur geringfügig beeinträchtigt wurde, zeigte silberbeschichtete Cellulose einen stärkeren Effekt. Erneute Zugabe des jeweiligen Materials nach 2 h erhöhte nur die Wirkung von Chitoskin<sup>®</sup> deutlich. Gegenüber einem methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA)-Stamm war die Wirkung aller Wundauflagen deutlich schwächer.

Auf das Wachstum eines *Pseudomonas aeruginosa*-Stamms hatten wiederum die Cellulose keinen, jedoch Chitoskin<sup>®</sup> und silberbeschichtete Cellulose höhere Aktivitäten. In Anwesenheit von Protein wurde die Wirkung der silberbeschichteten Wundauflage jedoch vollständig aufgehoben, während die von Chitoskin<sup>®</sup> über mindestens 3 h unbeeinträchtigt blieb. Bakterien auf einer Agarplatte wurden nach Auflage von Chitoskin<sup>®</sup> im Wachstum gehemmt, jedoch nicht abgetötet, sondern konnten nach Auflegen des Materials auf eine sterile Agarplatte übertragen werden.

Peter Heisig<sup>1</sup>  
Tatjana Claußen<sup>1</sup>  
Gerd Mayer<sup>2</sup>

1 Abteilung Pharmazeutische  
Biologie und Mikrobiologie,  
Institut für Pharmazie,  
Department Chemie,  
Universität Hamburg,  
Deutschland

2 Fa. Karl Beese (GmbH & Co.),  
Barsbüttel, Deutschland

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Chitoskin® Bakterienzellen adsorbiert und dadurch eine bakteriostatische Wirkung ausübt. Bei stärker kolonisierten Wunden könnte daher ein früher Wechsel der Wundauflage eine schnellere Erregerreduktion bewirken und so die Heilung begünstigen.

**Schlüsselwörter:** Chitosan, antibakteriell, Wundauflage

## Einleitung

Chitosan ist ein hydrophiles polykationisches Polymer, das aus Chitin, dem Hauptbestandteil von Crustaceen-Schalen, durch partielle chemische Desacetylierung im alkalischen Milieu preiswert gewonnen werden kann. Im Gegensatz zu synthetischen Polymeren weist es eine gute Biokompatibilität sowie Biodegradibilität auf. Chitosan ist im sauren Milieu gut wasserlöslich, bildet visköse Lösungen und zeigt eine Tendenz zur Koagulation mit Proteinen bei höheren pH-Werten. Für Chitosan ist in In-vitro-Studien eine antimikrobielle Wirkung gezeigt worden (Übersicht bei [1]). Dabei fanden sich MHK-Werte zwischen 10 und 5000 µg/ml für Pilze und zwischen 20 und 500 µg/ml für verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien. Wasserlöslichkeit und antimikrobielle Aktivität konnten durch verschiedene chemische Modifikationen verbessert werden [2], [3].

Das Präparat Chitoskin® besteht zu 50% aus Chitosan, das mit Gelatine als Trägermaterial zu einer Wundauflage verbunden ist. Diese bewirkt neben der Wundabdeckung einen guten Flüssigkeitstransport unter Aufrechterhaltung eines feuchten Wundmilieus. Die Matrix-Struktur von Chitoskin® gestattet ferner gute Adhäsions- und Proliferationsmöglichkeiten von granulierenden Zellen des Wundgrunds. Chitoskin® soll vorzugsweise bei tieferen, stark exsudierenden Wunden chronischen Ursprungs eingesetzt werden. Zudem werden seine hämostypischen Eigenschaften bei traumatischen Wunden diskutiert.

Mit der nachfolgenden Untersuchung soll geprüft werden, welche antibakterielle Aktivität gegenüber typischen Wunderregern wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* Chitoskin® im Vergleich zu anderen Wundabdeckungen in vitro aufweist.

## Material und Methoden

### Bakterienstämme

Als Testorganismen wurden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (häufige Kolonisation bzw. Infektion auf großflächigen Brandwunden), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (häufigster Erreger postoperativer Wundinfektionen) sowie als Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) ST547 (zur Verfügung gestellt von Prof. W. Witte, Robert-Koch-Institut, Bereich Wernigerode) verwendet.

### Wundauflagen

Chitoskin® Wundauflage, eine sterile Auflage aus Chitosan und Gelatine (Hersteller Sangui BioTech GmbH, Witten, Vertrieb BEESE GmbH Barsbüttel) Lot: 0507-117, haltbar bis 02-2009 wurde im Vergleich zu Material A, eine sterile Wundauflage aus oxidiertes, regeneriertes Cellulose (ORC) mit Kollagen und Silber-ORC, haltbar bis 12-2006, und Material B, eine Wundauflage aus oxidiertes, regeneriertes Cellulose (ORC) und Kollagen, haltbar bis 06-2007, geprüft.

### Bestimmung der antibakteriellen Aktivität in Flüssigmedium

Aus einer in flüssigem Nährmedium (Standard Nährmedium No. I-Bouillon, VWG-Eurolab, Darmstadt) zur stationären Phase gewachsenen Kultur wurde eine 1:200-Verdünnung bis zum Erreichen einer optischen Dichte ( $OD_{550}$ , gemessen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 550$  nm;) von  $0,125 \pm 0,02$  bei  $37^\circ\text{C}$  und  $130 \text{ Umin}^{-1}$  geschüttelt. Diese Trübung entsprach dem McFarland Standard 0,5 ( $=10^8$  KBE/ml).

Ausgehend von dieser Suspension wurden Aliquots entnommen und in 10 ml frische Bouillon gegeben, so dass die gewünschte Koloniezahl von  $10^5$  KBE/ml resultierte. Dazu wurden gleich große Stücke (ca. 2x2 cm von Chitoskin® oder eines der Vergleichsmaterialien A oder B gegeben und insgesamt bis zu 4,5 h inkubiert. Zu Chitoskin® und Material A wurde in einer separaten Versuchsreihe Rinderserumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 50 mg/ml gegeben. In einer weiteren Versuchsreihe wurde jeweils nach 2 h den Ansätzen ein zweites, gleich großes Stück der Wundauflage zugefügt. In Abständen von 30 bzw. 60 min wurden Proben zur Bestimmung der Lebendkoloniezahl nach serieller Reihenverdünnung entnommen. Aliquots von je 50 µl der verschiedenen Verdünnungen wurden auf Soja-Casein-Agarplatten (VWG-Eurolab, Darmstadt) ausplattiert und nach Inkubation über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  ausgezählt. Daraus wurden die Veränderungen der Lebendkoloniezahl im Vergleich zum Inokulum bestimmt und graphisch aufgetragen. Es wurden mindestens drei Parallelversuche durchgeführt. Die prozentualen Abweichungen in den Ergebnissen zweier Koloniezahlbestimmungen lagen innerhalb der für die Methode zu erwartenden Schwankungsbreite von  $\pm 0,3$  log-Stufen. Bestimmungen in Anwesenheit von BSA wurden exemplarisch nur einmal durchgeführt.

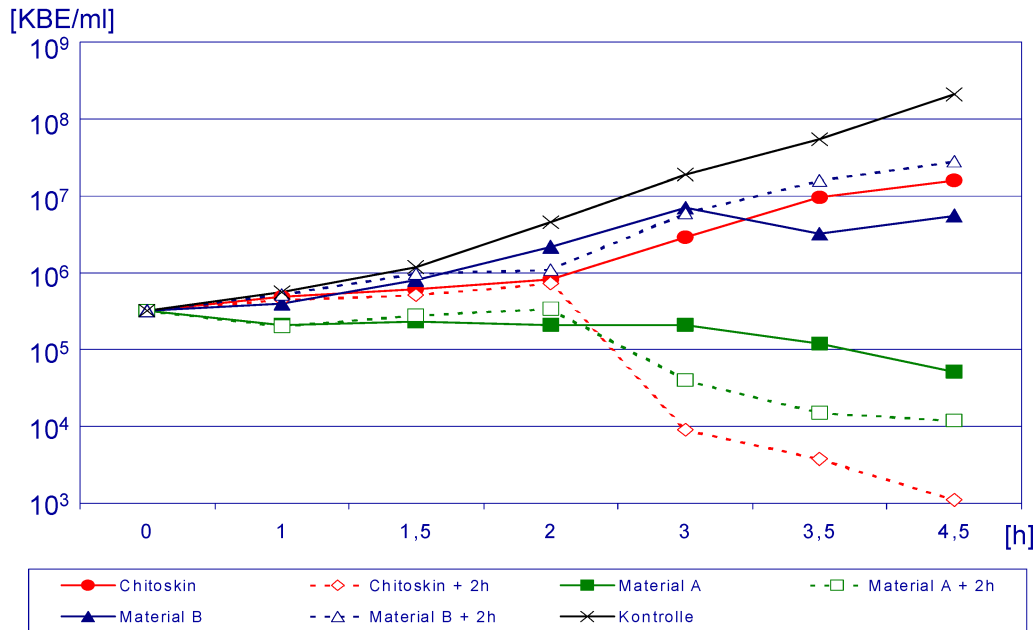


Abbildung 1: Koloniezahlveränderung von *S. aureus* ATCC25923 in Nährbouillon ohne (Kontrolle) und mit verschiedenen Wundauflagen

## Bestimmung der antibakteriellen Aktivität auf Agar

Einige Kolonien einer frischen Übernacht-Kultur wurden mit einem sterilen Glasstab in 4,5 ml steriler, isotonischer Kochsalzlösung bis zu einer Trübung suspendiert, die dem McFarland Standard 0,5 entspricht ( $KbE = 10^8/ml$ ). Mit sterilen Wattestäbchen (1x in Inokulum eingetaucht) wurden die Testorganismen in drei verschiedenen Richtungen gleichmäßig auf dem Agar ausgestrichen. Nach dem Eintrocknen wurde jeweils eine unter aseptischen Bedingungen auf die gewünschte Größe zugeschnittene Probe der jeweiligen Wundaufgabe für 1, 3 bzw. 18 h aufgelegt. Danach wurde das Material unter aseptischen Bedingungen abgenommen und für ca. 5 s auf eine frische Agarplatte aufgelegt, die erneut für 18 h bebrütet wurde. Das bakterielle Wachstum nach der Bebrütung wurde visuell beurteilt und fotografisch dokumentiert.

## Ermittlung des Wasseraufnahmevermögens

Wundaufgaben wurden in der Größe 2 cm x 2 cm ausgeschnitten und jeweils zu Beginn und nach Ablauf der Bebrütungszeit auf den Agarplatten gewogen. Als Kontrolle wurden die Aufgaben auf eine unbeimpfte Agarplatte sowie in eine agarfreie Petrischale aufgelegt.

## Ergebnisse

Die Änderungen der Lebendkoloniezahlen während der 4,5 stündigen Inkubation mit den verschiedenen Wundaufgaben sind für *S. aureus* ATCC 25923 (Abbildung 1), *S. aureus* ST547 MRSA (Abbildung 2) und *P. aeruginosa*

(Abbildung 3) graphisch dargestellt. Die Ergebnisse repräsentieren jeweils typische Verläufe eines Experiments aus einer Serie von mindestens 3 Parallelansätzen. Die Koloniezahl stieg in den Ansätzen mit der Wundabdeckung aus reiner Cellulose (Material B) bei allen drei Isolaten ähnlich an wie die der jeweiligen Kontrolle (Abbildung 1, Abbildung 2 und Abbildung 3). Der Zusatz einer zweiten Materialprobe B nach 2 h hatte keinen erkennbaren Einfluss (Abbildung 1).

In Anwesenheit von Material A wurde eine leicht reduzierte Koloniezahl des *S. aureus* ATCC 25923-Isolats bestimmt ( $< 1$  log-Stufe); durch Zugabe einer zweiten Materialprobe A nach 2 h war eine weitere Reduktion um 1 log-Stufe erkennbar.

In der Probe mit Chitoskin® lag die Koloniezahl nach 4,5 h um fast zwei log-Stufen höher als zu Beginn, jedoch wurde nach Zugabe einer zweiten Materialprobe zu  $t=2$  h eine deutliche Koloniezahlverminderung um mehr 2 log-Stufen innerhalb 1 h bzw. 3 log-Stufen am Ende des Experiments beobachtet. Damit lag dieser Wert sogar noch um 1 log-Stufe unterhalb des Wertes für Material A mit zweiter Probe (Abbildung 1).

Gegenüber dem MRSA-Stamm ST547 zeigte sich lediglich bei Material A eine leichte Koloniezahlreduktion (ca. 1 log-Stufe), für alle übrigen Proben wurde eine Erhöhung der Koloniezahl zwischen 1 (Chitoskin®) und 2 log-Stufen bestimmt (Material B, Kontrolle; Abbildung 2).

Die Lebendkoloniezahl von *P. aeruginosa* lag in der Probe mit Material A nach 1 h um etwa 2,5 log-Stufen niedriger als zu Beginn. Die Zugabe einer zweiten Materialprobe A nach 2 h konnte somit keine Verstärkung dieses Effekts erbringen (Abbildung 3). In Anwesenheit von Material B nahm dagegen die Lebendkoloniezahl genauso zu wie bei der Wachstumskontrolle, unabhängig davon, ob nach 2 h eine zweite Materialprobe B zugesetzt wurde oder nicht.

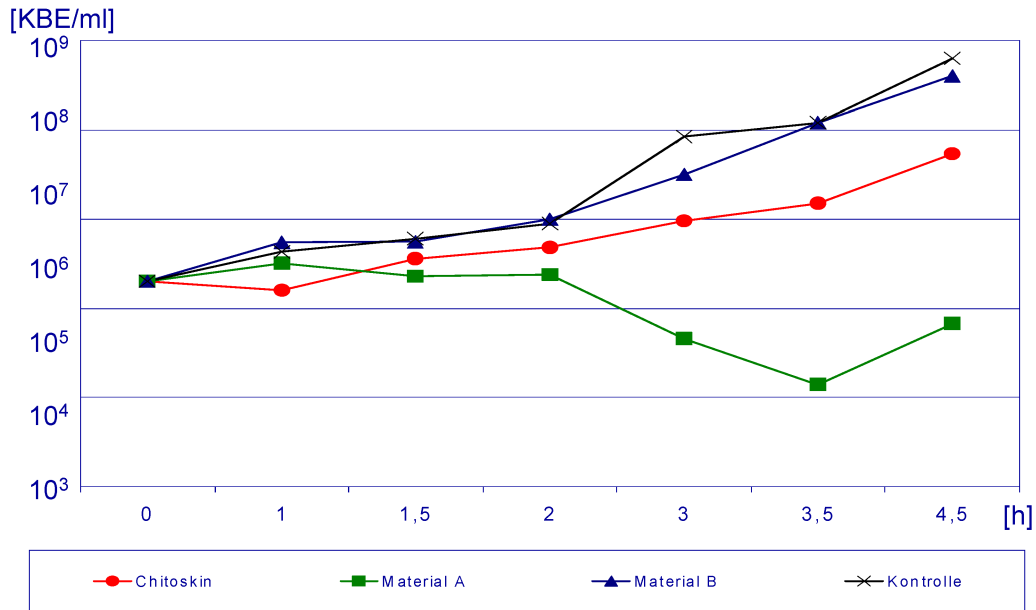


Abbildung 2: Koloniezahlveränderung von *S. aureus* ST547 in Nährbouillon ohne (Kontrolle) und mit verschiedenen Wundauflagen

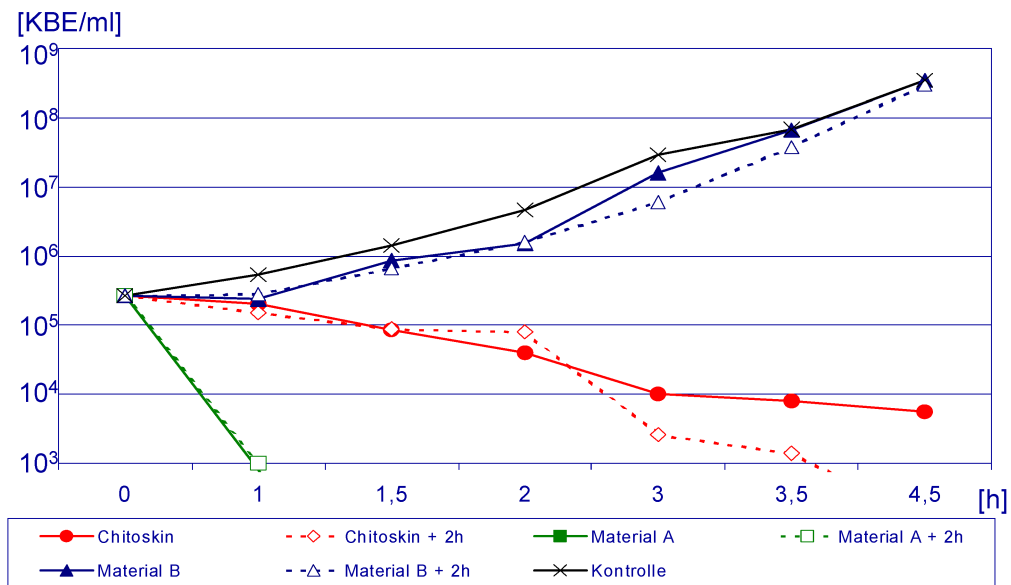


Abbildung 3: Koloniezahlveränderung von *P. aeruginosa* ATCC27583 in Nährbouillon ohne (Kontrolle) und mit verschiedenen Wundauflagen

In der Probe mit Chitoskin® war die Lebendkoloniezahl von *P. aeruginosa* ATCC 27853 nach 4,5 h um fast 2 log-Stufen (einzelne Materialprobe) niedriger als zu Beginn. Wurde nach 2 h eine zweite Materialprobe zugesetzt, lag die Koloniezahl sogar um 3,5 log-Stufen niedriger als zu Beginn (Abbildung 3).

Um einen möglichen Einfluss von Proteinen, wie sie im Wundsekret enthalten sind, auf die Wirksamkeit der Wundauflagen zu prüfen, wurde die Untersuchung für *P. aeruginosa* in Anwesenheit von Rinderserumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 50 mg/ml wiederholt. Diese Konzentration entspricht der Albuminkonzentration im Serum. Während sich die Testorganismen in den Ansätzen ohne BSA wie bereits bekannt (Abbildung 3) ver-

hielten, blieb die Koloniezahl in dem Ansatz mit Material A und BSA über den Untersuchungszeitraum auf dem Ausgangswert. In dem Ansatz mit Chitoskin® lag dagegen die Koloniezahl nach 3 h fast genauso niedrig wie in der Probe mit Chitoskin® und BSA (Abbildung 4).

Um zu prüfen, ob die beobachtete Verringerung der Koloniezahl in Ansätzen mit Chitoskin® auf eine Abtötung der Bakterienzellen zurückzuführen ist, wurden gleichgroße Proben von Chitoskin® für 1, 3 und 18 h auf Nähragarplatten aufgelegt, die mit dem Teststamm *S. aureus* ATCC 29523 beimpft waren. Nach der Bebrütungszeit wurden die Chitoskin®-Proben entfernt. Auf den Auflageflächen zeigte sich nach kurzer Bebrütung deutlich verringertes, nach 18 h Bebrütung sogar überhaupt kein Wachstum.

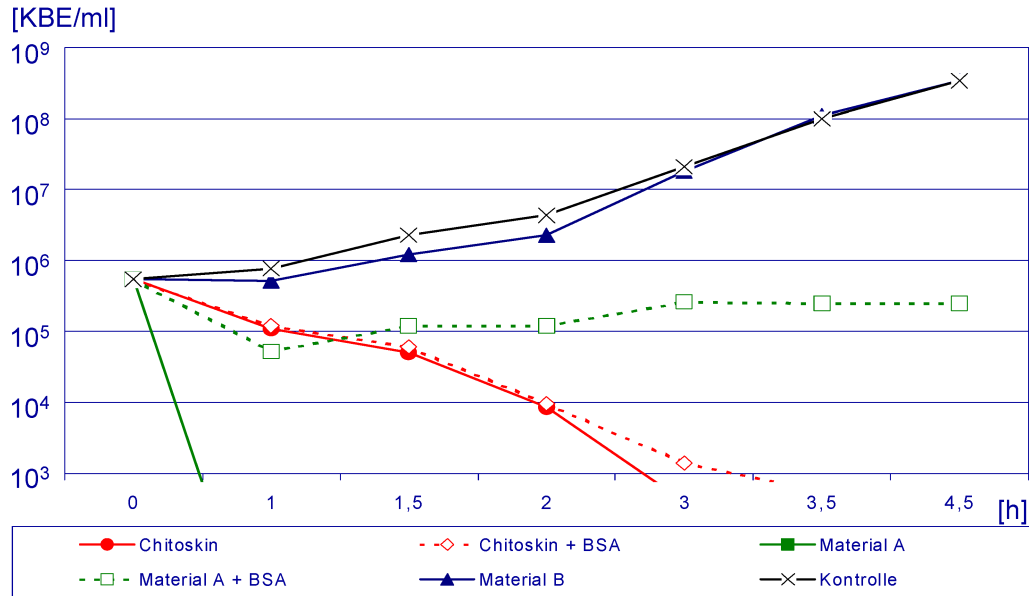


Abbildung 4: Koloniezahlveränderung von *P. aeruginosa* ATCC27583 in Nährbouillon ohne (Kontrolle) und mit verschiedenen Wundauflagen sowie BSA

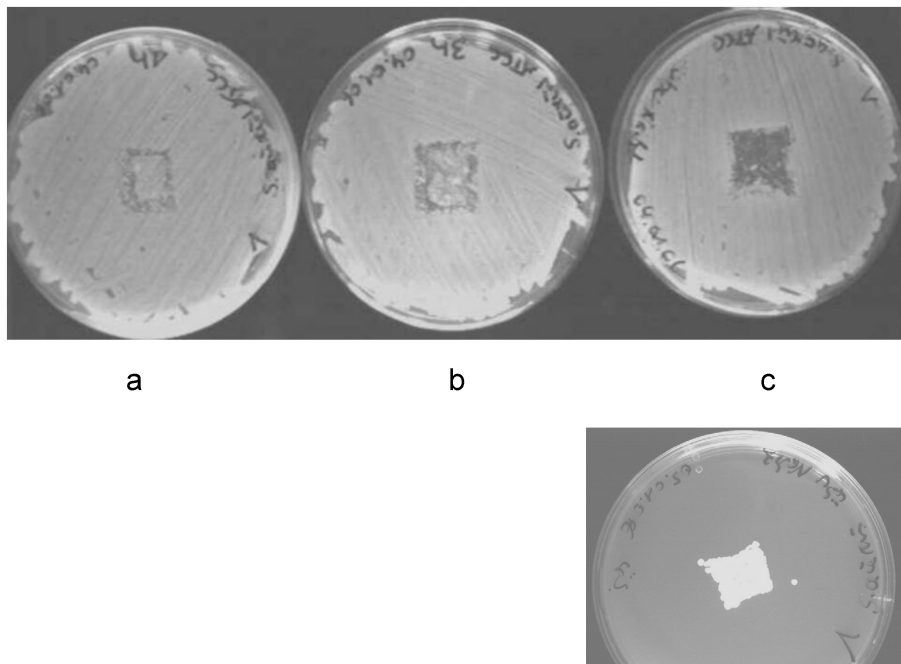


Abbildung 5: *S. aureus* ATCC 25923-Zellen auf Caso-Agar mit aufgelegtem Chitoskin® Material für (a) 1 h, (b) 3 h und (c) 18 h bebrütet. (d) Ergebnis der Bebrütung nach Auflage des Chitoskin®-Materials aus (c) für 5 s

Wurden die Proben nach der jeweiligen Bebrütungszeit kurz auf frische, unbeimpfte Agarplatten gelegt und diese anschließend erneut bebrütet, war für beide Testkeime deutliches Wachstum erkennbar (Abbildung 5). Mit zunehmender Bebrütungszeit des Chitoskin®-Materials auf den bakterienhaltigen Platten nahm die Koloniedichte zu. Durch Auflage der Wundabdeckungen auf unbeimpfte Agarplatten wurde das Wasseraufnahmevermögen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 zusammengefasst und zeigen eine Wasseraufnahme um bis zu 900% des

Eigengewichts nach Bebrütung für 18 h. Nach 1 h war das Eigengewicht bereits um 500% erhöht.



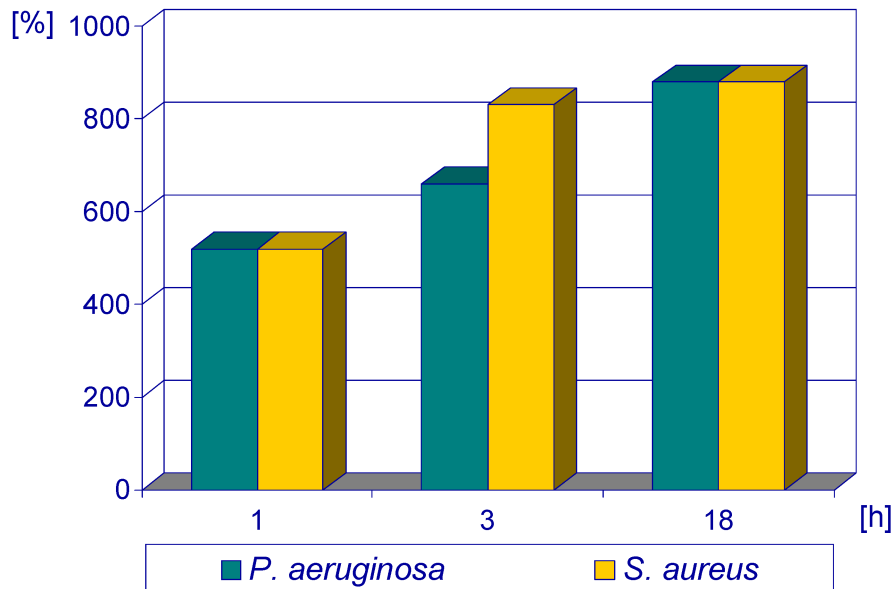


Abbildung 6: Wasseraufnahmevermögen von Chitoskin® nach Auflegen auf Agar

## Diskussion

Eine antimikrobielle Wirkung stellt neben der Wundabdeckung und der Schaffung eines ausgewogen feuchten Milieus ein wichtiges Qualitätskriterium moderner Wundabdeckungen dar. Für Wundabdeckungen mit Silberbeschichtung wird die antimikrobielle Aktivität mit einem oligodynamischen Effekt des Silbers erklärt, was durch die hier vorgestellten Versuche bestätigt wird. Jedoch fehlen bislang konkrete Daten für Wundauflagen auf der Basis von Chitosan. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität von Chitoskin® zeigen, dass sich in einem einfachen In-vitro-System sowohl die Zahl vermehrungsfähiger gram-positiver (*S. aureus*) als auch gram-negativer (*P. aeruginosa*) Bakterien durch Zusatz von Chitoskin® reduzieren lässt. Dieser Effekt ist gegenüber *P. aeruginosa* stärker (Abbildung 3 und Abbildung 4), gegenüber *S. aureus* erst nach Zugabe einer zweiten Materialprobe erkennbar (Abbildung 1).

Wird den Versuchsansätzen Protein (BSA 50 mg/ml) zugesetzt, um die Testbedingungen den Verhältnissen in Wundsekret anzunähern, erweist sich die Silberbeschichtung als nachteilig, da der keimzahlvermindernde Effekt vollständig aufgehoben wird (Abbildung 4). Auf die Wirksamkeit von Chitoskin® hat der Zusatz von Protein dagegen fast keinen Einfluss (Abbildung 4). Während die Silberschicht offensichtlich eine starke Interaktion mit dem Protein zeigt, vor allem über Wechselwirkungen mit Schwefelatomen des Methionins und Cysteins, scheint die Wirkung des Chitoskin®-Materials durch Protein nicht merkbar beeinträchtigt zu werden (Abbildung 4).

Eine plausible Erklärung zum möglichen Wirkungsmechanismus von Chitoskin® auf Bakterien liefern die ergänzende Untersuchung mittels Agarplatten (Abbildung 5) sowie die Bestimmung des Wasseraufnahmevermögens. Demnach besitzt Chitoskin® ein hohes Wasseraufnahmever-

mögen (Abbildung 1) sowie eine hohe Bindungskapazität für Bakterienzellen. Diese werden jedoch nicht abgetötet, sondern in lebensfähiger Form gebunden und damit lediglich an der weiteren Vermehrung gehindert, denn nach kurzem (5 s) Auflegen der bakterienhaltigen Wundaufgabe können die Zellen auf eine frische Agarplatte übertragen und dort vermehrt werden (Abbildung 5). Dieser postulierte Mechanismus der Wachstumshemmung durch Bindung wird unterstützt durch die Befunde der Versuche in Flüssigmedium: So zeigen beide Testorganismen nach Zugabe einer zweiten, frischen Chitoskin®-Probe nach 2 h eine deutliche Reduktion der Anzahl freier, lebender Testorganismen.

Für eine verbesserte Wundhygiene bei stark kontaminierten Wunden erscheint daher ein frühzeitiger Wechsel der Chitoskin®-Wundaufgabe innerhalb von 1-2 h günstig, um dadurch die der Auflage anhaftenden Erreger rasch aus dem Wundbereich zu entfernen. Vorteilhaft ist dabei, dass dieser Effekt auch in Anwesenheit von Proteinen wirksam ist. Die Übertragbarkeit dieser in vitro gewonnenen Erkenntnisse erfordert weiterführende klinische Studien sowohl in Hinblick auf die antiseptische Effektivität als auch in Hinblick auf die Beeinflussung der Wundheilung.

## Literatur

1. Rabea EI, Badawy M E-T, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent : Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4:1457-65.
2. Denkbas EB, Öztürk E, Özdemir N, Kececi K. Norfloxacin-loaded chitosan sponges as wound dressing material. *J Biomater Applicat*. 2004;18:291-303.
3. Singla AK, Chawla M. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53:1047-67.

**Korrespondenzadresse:**

Peter Heisig  
Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie,  
Institut für Pharmazie, Department Chemie, Universität  
Hamburg, Bundesstraße 45, D-20146 Hamburg,  
Deutschland, Tel: ++49-40-42838-3899, FAX: ++49-40-  
42838-3895  
heisig@chemie.uni-hamburg.de

**Bitte zitieren als**

Heisig P, Claußen T, Mayer G. Nachweis der antibakteriellen Aktivität  
von Chitosan. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2007;2(2):Doc39.

**Artikel online frei zugänglich unter**

<http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000072.shtml>

**Copyright**

©2007 Heisig et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.