

# Antibakterielle und Antibiofilm-Wirkung von radioaktivem Thermalwasser

A.C. IONESCU<sup>1</sup>, R. MATTINA<sup>1</sup>, E. BRAMBILLA<sup>1</sup>, M. RALLI<sup>2</sup>,  
F.M. PASSALI<sup>3</sup>, D. PASSALI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut für biomedizinische, chirurgische und zahnmedizinische Wissenschaften, Universität Mailand, Mailand Italien

<sup>2</sup>Institut für Sinnesorgane, Universität Sapienza Rom, Rom, Italien

<sup>3</sup>Institut für Otolaryngologie, Universität Tor Vergata, Rom, Italien

<sup>4</sup>Institut für Otolaryngologie, Universität Siena, Siena Italien

**Abstract. – ZIELSETZUNG:** Die meisten Infektionen der oberen Atemwege werden durch biofilmbildende Mikroorganismen verursacht, die zur Gattung *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Enterobacter* gehören. Viele dieser Mikroorganismen besitzen auch eine Antibiotikaresistenz, die teilweise mit der Biofilmbildung zusammenhängt. Zur Behandlung dieser Infektionen kann die Inhalation von radioaktivem Thermalwasser (RTW) eingesetzt werden. Ziel der vorliegenden Studie war es, die In-vitro-Antibiofilm-Wirkung von RTW aus den Quellen von Meran (Italien) zu untersuchen.

**MATERIALIEN UND METHODEN:** Es wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um die Wirkung von RTW auf planktonische Kulturen (1 h Exposition) und auf Biofilme (10 min und 1 h Exposition) zu untersuchen, die von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* gebildet wurden. Die lebensfähige Biomasse wurde mit einem kolorimetrischen Assay bestimmt. Zur morphologischen Untersuchung der antibakteriellen Wirkung von RTW wurde ein Modell verwendet, das auf der Infektion eines rekonstituierten humanen respiratorischen Epithels (RHRE) durch die gleichen Stämme basiert.

**ERGEBNISSE:** RTW verringerte die Lebensfähigkeit von planktonischen Kulturen von *S. aureus* und *S. pneumoniae* um etwa 20%. RTW verringerte auch die Lebensfähigkeit des Biofilms bei allen Stämmen außer *E. coli* zu beiden Zeitpunkten. Im RHRE-Modell kam es in allen Proben zu einer bakteriellen

Adhärenz und Kolonisation, die eine besondere Affinität zu den Zilien des Epithels zeigten. Bakterielle Infektionen verursachten signifikante Veränderungen in der Epithelstruktur, die eine Vergrößerung der Interzellularräume und eine Schädigung der Zellstruktur aufwiesen. Mit *S. aureus* infizierte Proben zeigten nach der RTW-Behandlung eine etwas geringere Kolonisation.

**SCHLUSSFOLGERUNGEN:** Die Ergebnisse dieser In-vitro-Studie zeigten eine signifikante Wirkung von RTW gegen grampositive planktonische Bakterienzellen sowie eine signifikante Antibiofilm-Aktivität.

## Schlüsselwörter:

*Thermalwasser, Atemwegsinfektionen, Biofilme, rekonstituiertes Epithel, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli.*

## Einleitung

Atemwegsinfektionen sind ein signifikantes Problem im öffentlichen Gesundheitswesen, insbesondere bei älteren Menschen, und sind eine der Hauptursachen für Morbidität. Die meisten dieser Infektionen betreffen die oberen Atemwege, und die am häufigsten beteiligten Spezies gehören zur Gattung *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Enterobacter*<sup>1-5</sup>. Viele dieser Mikroorganismen sind resistent gegen die in der allgemeinen Praxis verwendeten Antibiotika, wie Ampicillin, Amoxicillin oder Kanamycin<sup>6,7</sup>. Dieses Problem stellt eine Einschränkung der Behandlungsmöglichkeiten solcher Infektionen

dar<sup>8,9</sup> und treibt die Forschung nach alternativen Therapien voran.

Die meisten dieser Mikroorganismen bilden auch Biofilme; Biofilme können das Atemwegsepithel stabil besiedeln und zu chronischen und wiederkehrenden Infektionen führen<sup>4,10-12</sup>. Durch die organische Struktur des Biofilms können viele Strategien, einschließlich der interzellulären Kommunikation (Quorum Sensing), angewendet werden, die zu einer erhöhten antimikrobiellen Resistenz beitragen<sup>10</sup>. Zelluläre Strukturen wie Geißeln, Pili und extrazelluläre Matrix sind grundlegend für die Adhärenz und die Erstbesiedlung, wodurch Spezies wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* besonders geeignet für die Entwicklung solcher chronischen Infektionen sind<sup>13</sup>. Darüber hinaus werden planktonische mikrobielle Zellen als Folge einer Ausbreitungsaktivität aus Biofilmen freigesetzt, was eine weitere Besiedlung ermöglicht. Folglich können Biofilme als Infektionsherde fungieren, die neue metastatische Infektionsnester bilden können<sup>14</sup> und somit eine entscheidende Rolle in der Pathogenese wiederkehrender Atemwegsinfektionen spielen.

<sup>222</sup>Rn ist ein Zerfallsprodukt von <sup>238</sup>U mit einer relativ kurzen Halbwertszeit (ca. 91 h); <sup>222</sup>Rn gelangt durch verschiedene Quellen, u. a. Thermalwasser, an die Erdoberfläche und trägt erheblich zur Strahlenexposition des Menschen bei<sup>15-18</sup>. Die Radioaktivität dieses Elements beruht auf der Erzeugung von  $\alpha$ -Teilchen, die eine sehr hohe kinetische Energie und ein geringes Eindringvermögen aufweisen, sodass es bei Kontakt mit Geweben und Biofilmen wirksam werden kann<sup>19</sup>.

Die Thermalquellen in Meran (Italien) haben eine radioaktive Wirkung, die Berichten zufolge einen Wert von 481 Bq/l aufweist<sup>20,21</sup>. Zur Behandlung von chronischen Erkrankungen der oberen Atemwege wird sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern häufig die Inhalation von radioaktivem Thermalwasser (RTW) eingesetzt<sup>20,22-24</sup>. Die therapeutischen Mechanismen dieser Behandlungsform sind jedoch nicht vollständig geklärt. <sup>222</sup>Rn ist dafür bekannt, dass

es die antioxidative Aktivität erhöht und die Immunantwort im menschlichen Körper unterdrückt<sup>25,26</sup>. Seine Aktivität könnte auf seine Interaktion mit den lipidischen Komponenten der eukaryotischen Zellmembran zurückzuführen sein. Es wurde vermutet, dass <sup>222</sup>Rn auch mit den Lipiden der bakteriellen Zellwände interagieren könnte, was möglicherweise ihr Wachstum beeinflusst<sup>26</sup>. Derzeit gibt es keine Leitlinien für den Einsatz von RTW zur Behandlung von Biofilm-assoziierten chronischen Atemwegsinfektionen<sup>27</sup>.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die antibiofilmische Wirkung des Meraner RTW in vitro zu untersuchen. Die Nullhypothese lautete, dass RTW im Vergleich zu Leitungswasser (MW, mains water) keine signifikanten Unterschiede in der Antibiofilmwirkung zeigt.

## Materialien und Methoden

### **Entnahme von Wasserproben**

Das getestete RTW wurde in Pyrex-Glasflaschen durch Spülen ohne Verwirbelung gesammelt, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Das Thermalwasser wurde innerhalb von vier Stunden nach der Probenahme getestet und zwar als 97% der Restaktivität vorhanden war, um den Radonverlust durch Zerfall zu minimieren. Die gemessene Aktivität von <sup>222</sup>Rn an der Entnahmequelle entsprach 2050 Bq/l, und die Restaktivität des getesteten Thermalwassers entsprach 1988,5 Bq/l. Die antibiofilmische Wirkung des RTW wurde mit der des unmittelbar vor den Experimenten entnommenen Leitungswassers (Abkürzung aus dem Englischen: MW) verglichen. Die Zusammensetzung sowohl von RTW als auch von MW ist in Tabelle I dargestellt. Alle Wasserproben wurden filtersterilisiert (Millipore-Filter, 0,2  $\mu$ m). Um einen Einfluss der Filtrationsverfahren auf die Restradioaktivität des RTW auszuschließen, wurde ein Vorversuch durchgeführt.

### **Mikrobiologische Verfahren**

Kulturmedien und Reagenzien wurden von Becton-Dickinson (BD Diagnostics-Difco,

Franklin Lakes, NJ, USA) bezogen. Mit Gewebekultur behandelte Multiwell-Polystyrolplatten (Nunc 96-Well, 48-Well und 24-Well) wurden von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bezogen. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 und ein Stamm von *Streptococcus pneumoniae*, die von einem Patienten isoliert wurden, der an einer Infektion der oberen und unteren Atemwege litt, wurden auf Columbia Agar gezüchtet, der mit 5 % Schafblut versetzt war. Die Platten wurden bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 48 h inkubiert. Eine Suspension jedes Mikroorganismus wurde in Brain Heart Infusion (BHI) nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gewonnen. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (2200/min, 19 °C, 5 min) gewonnen, zweimal in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS)

ser Wert entspricht einer ungefähren mikrobiellen Konzentration von  $6,00 \times 10^8$  Zellen/mL.

### **Untersuchung der RTW-Wirkung auf Bakterienzellen in der planktonischen Phase**

Für diesen Test wurden insgesamt 500 µl jeder Bakteriensuspension und 500 µl Wasser in die Wells von 48-Well-Platten gegeben. Für jeden Mikroorganismus wurden insgesamt 32 Wells verwendet; 16 Wells wurden mit RTW-Wasser inkubiert, während die andere Hälfte (n = 16) mit MW (Leitungswasser) inkubiert wurde. Die Platten wurden bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre eine Stunde lang inkubiert. In jede mit Thermalwasser inokulierte Kavität (Wells) wurde den Bakterienzellen innerhalb einer Stunde eine Dosis von etwa 1 Bq verabreicht, wodurch etwa 3600 Zerfälle erreicht wurden. Anschließend erfolgte die Auswertung der lebensfähigen Bakterienzellen mit einem kolorimetrischen Test auf Basis der Reduktion eines Tetrazoliumsalses (MTT-Assay).

**Tabelle I.** Chemische Analyse des Kontrollwassers (Leitungswasser).

Zusammensetzung	
pH	7,6
Filtratrockenrückstand	384 mg/L
Härte	31 °F
Elektrische Leitfähigkeit	591 µS/cm, 20°C
Ca	83 mg/L
Mg	18,9 mg/L
NH <sub>4</sub>	< 0,10 mg/L
Cl	34 mg/L
SO <sub>4</sub>	54 mg/L
K	2 mg/L
Na	18 mg/L
AS	< 2 µg/L
CO <sub>3</sub>	234 mg/L
F	< 0,5 mg/L
NO <sub>3</sub>	31 mg/L
NO <sub>2</sub>	< 0,20 mg/L
Mn	< 1 µg/L

gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert. Alle Suspensionen wurden mit Ultraschall behandelt, um die bakteriellen Aggregate zu dispergieren (Sonifier Modell B-15, Branson, Danbury, CT, USA, 7 W für 30 s), und mit einem Spektrophotometer bei 550 nm (Genesys 10-S, ThermoSpectronic, Rochester, NY, USA) auf 0,3 optische Dichteeinheiten (OD) eingestellt. Die-

### **Untersuchung der RTW-Wirkung auf Biofilme**

Für diesen Test wurden insgesamt 20 µl jeder Bakteriensuspension und 180 µl steriles BHI in die Wells von 96-Well-Platten gegeben. Für jeden Mikroorganismus wurden vierundsechzig Wells verwendet. Die Platten wurden bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 24 h inkubiert, um einen mehrschichtigen Biofilm zu entwickeln. Anschließend wurde das Kulturmedium durch sanftes Absaugen entfernt und die Wells wurden dreimal mit 100 µl steriler PBS gewaschen. Insgesamt wurden jeweils 200 µl filtriertes steriles Wasser in die Wells gegeben (RTW, n = 32, und MW, n = 32). Die Platten wurden dann für weitere 10 min (n = 16) oder eine Stunde (n = 16), unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben, inkubiert.

In jeder mit RTW inokulierten Well wurde innerhalb von 10 min bzw. einer Stunde eine Dosis von ca. 0,4 Bq verabreicht, wodurch ca. 240 bzw. 1440 Zerfälle erreicht wurden. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Suspension

durch vorsichtiges Absaugen aus den Wells entfernt. Anschließend wurden die Wells dreimal vorsichtig mit steriler PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Danach wurde die Auswertung der lebensfähigen Biomasse mit dem MTT-Test durchgeführt.

Dieses Experiment wurde nach zehn Tagen mit dem gleichen Aufbau wiederholt, wobei die Biofilme eine Stunde lang den Wasserproben exponiert wurden. Biofilme, die mit RTW behandelt wurden, waren somit der Wirkung einer geschätzten Restaktivität von  $^{222}\text{Rn}$  von etwa 16% der ursprünglichen Aktivität (318 Bq/l) ausgesetzt.

### **Untersuchung der lebensfähigen Bakterienzellen**

Der MTT-Test wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt<sup>28</sup>. Kurz zusammengefasst, wurden zwei Starter-MTT-Stammlösungen durch Auflösen von 5 mg/mL 3-(4,5)-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in steriler PBS und 0,3 mg/mL N-Methylphenaziniummethylsulfat (PMS) in steriler PBS hergestellt. Die Lösungen wurden bei 2 °C in lichtundurchlässigen Fläschchen bis zum Tag des Experiments gelagert. Dann wurde eine frische Messlösung (FMS) durch Mischen von 1 mL MTT-Stammlösung, 1 mL PMS-Stammlösung und 8 mL sterilem PBS hergestellt. Eine Lysierlösung (LS) wurde durch Auflösen von 10% v/v Natriumdocylsulfat und 50% v/v Dimethylformamid in destilliertem Wasser hergestellt.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Platten einem MTT-Test zur Untersuchung der adhärenenten, lebensfähigen und metabolisch aktiven Biomasse wie folgt unterzogen: 200 µl FMS wurden in jede Well der 48-Well-Platten pipettiert, die für die Bestimmung der Wirkung auf planktonische Kulturen verwendet wurden. In jede Well der 96-Well-Platten, die für die Experimente zur Biofilmbildung verwendet wurden, wurden insgesamt 100 µl FMS pipettiert. Alle Platten wurden für eine Stunde bei 37 °C unter lichtdichten Bedingungen inkubiert.

Während der Inkubation wurde das gelbe MTT-Salz durch Elektronentransport durch die

mikrobielle Plasmamembran und, in geringerem Maße, durch mikrobielle Redoxsysteme in unlösliches violettes Formazan umgewandelt. Die Umwandlung wurde durch den intermediären Elektronenakzeptor (PMS) ermöglicht. Danach wurden insgesamt 500 µl aus jeder Well der 48-Well-Platten in neue Platten überführt und 500 µl LS hinzugefügt. In den 96-Well-Platten wurde das nicht umgesetzte FMS vorsichtig durch Absaugen aus den Wells entfernt, und die Formazan-Kristalle wurden dann durch Zugabe von 100 µl LS in jede Well aufgelöst. Alle Platten wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde lichtdicht inkubiert. Insgesamt 90 µl der Suspension aus jeder Well wurden dann in neue 96-Well-Platten überführt und die optische Dichte (550 nm) wurde gemessen (Genesys 10-S).

### **Untersuchung der RTW-Wirkung auf Biofilme - Entwickelt am rekonstituierten Atemwegsepithelmodell**

Um die klinischen Bedingungen so genau wie möglich zu simulieren, wurde ein Modell des rekonstituierten menschlichen Atemwegsepithels (RHRE, MucilAir™-Platten, Epithelix Sàrl, Plan-les-Ouates, Genf, Schweiz) mit den verschiedenen Stämmen infiziert und für die Bewertung der Wirkung des RTW auf die Bildung von Biofilmen verwendet.

Für dieses Experiment wurden insgesamt 30 RHRE-Proben (sechs Proben für jeden getesteten Mikroorganismus und sechs Kontrollproben) verwendet. Die Proben wurden in 24-Well-Platten mit Agarose-Nährstoff-Transportmedium versandt. Nach der Ankunft im Labor wurden die Beutel mit den Proben unter einem Laminarströmungsabzug geöffnet. Die Proben wurden aus den Transportplatten entnommen, und die Agarose wurde entfernt. Dann wurden die Proben in 6-Well-Platten mit Nährmedium (RPMI-1640-Medium, ergänzt mit 20,0 % fötalem Rinderserum, 1,0% L-Glutamin und 1,0% Penicillin/Streptomycin) gegeben. Vor dem Test wurden die Kulturplatten bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert.



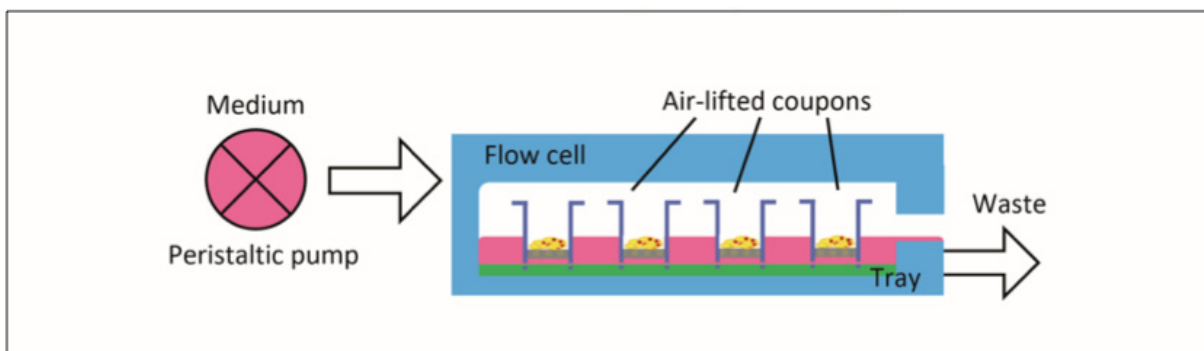
Für diese Studie wurde ein modifizierter Drip-Flow-Bioreaktor (MDFR) verwendet (Abbildung 1). Das Gerät ist eine Modifikation eines kommerziell erhältlichen Drip-Flow-Reaktors (DFR 110, Biosurface Technologies, Bozeman, MT, USA). Das modifizierte Design ermöglichte die Platzierung angepasster Schalen auf dem Boden der Strömungszellen und das Einbringen der per Airlift angehobenen RHRE-Probenträger in das umgebende strömende Nährmedium<sup>29,30</sup>. Alle Schläuche und Proben enthaltenden Schalen des MDFR wurden vor Beginn des Experiments mit einem Sterilisationssystem auf Wasserstoffperoxidbasis (Sterrad, ASP, Irvine, Ca, USA) sterilisiert. Durch die Begrenzung der Maximaltemperatur auf 45 °C wird eine hitzebedingte Schädigung des gesamten Systems vermieden. Der MDFR wurde dann in einer sterilen Haube montiert. Die Proben wurden in fünf Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schalen mit jeweils sechs Löchern platziert und somit fixiert und ihre Oberflächen dem Strömungsmedium ausgesetzt. Alle Schalen wurden auf dem Boden der Strömungskammern des MDFR fixiert und sofort mit frischem Nährmedium inokuliert. Der MDFR wurde in einen Inkubator gebracht, der bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit arbeitet. Dann wurde eine computergesteuerte Mehrkanal-Peristaltikpumpe (RP-1, Rainin, Emeryville, CA, USA) aktiviert, um einen konstanten Fluss von Nährmedium durch die Strömungszellen zu gewährleisten (9,6 ml/h).

mungszellen zu gewährleisten (9,6 ml/h).

Nach 24 h wurde die Pumpe deaktiviert und insgesamt 100 µl jeder Bakteriensuspension wurden auf die Oberfläche von jeweils sechs Probekörpern in den ersten vier Strömungszellen pipettiert. Die verbleibende Strömungszelle wurde als Negativkontrolle belassen. Um die Entwicklung eines mehrschichtigen Biofilms auf den Oberflächen der RHRE zu ermöglichen, wurde der Bioreaktor für weitere 24 h aktiviert. Danach wurde die Durchströmung gestoppt, die Proben vorsichtig entnommen und drei Proben für jede Gruppe wurden dem jeweiligen Testwasser (RTW oder MW) ausgesetzt. Nach einer Stunde wurden die morphologischen Eigenschaften der Proben mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht.

### **Morphologische Analyse mit REM**

Die Proben für die REM-Analyse wurden dreimal vorsichtig mit steriler PBS gespült, um nicht adhärente Zellen zu entfernen, und dann für 48 h in eine cacodylatgepufferte 2%ige Glutaraldehyd-Fixierlösung (pH = 7,4) gelegt. Anschließend wurden die Proben durch eine abgestufte Ethanolreihe (50, 70, 80, 85, 90, 95 und 100%, v/v) geleitet. Schließlich wurden die Proben einer Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen (Critical-Point Dryer, EMS 850, Hatfield, PA, USA), mit leitfähigem Klebstoff auf Stifte montiert, sputterbeschichtet (JEOL FFC-1100,



**Abbildung 1.** Funktionsschema des Bioreaktors mit RHRE-Probenträgern. Die Peristaltikpumpe sorgt für eine konstante Strömung von Zusatzmedium zu den Strömungszellen für die vorgegebene Zeit. Die Proben konnten durch Entfernen des Deckels des Bioreaktors unter sterilen Bedingungen mit den getesteten Bakterienstämmen infiziert werden. Auf die gleiche Weise konnten die Proben dem Test- oder Kontrollwasser ausgesetzt werden.

Japan) und mit einem Rasterelektronenmikroskop (JEOL JSM-840A, Japan) bei Vergrößerungen von 5000×15000× untersucht. Für jede Probe wurden vier zufällig ausgewählte Felder erfasst.

**Statistische Analyse**

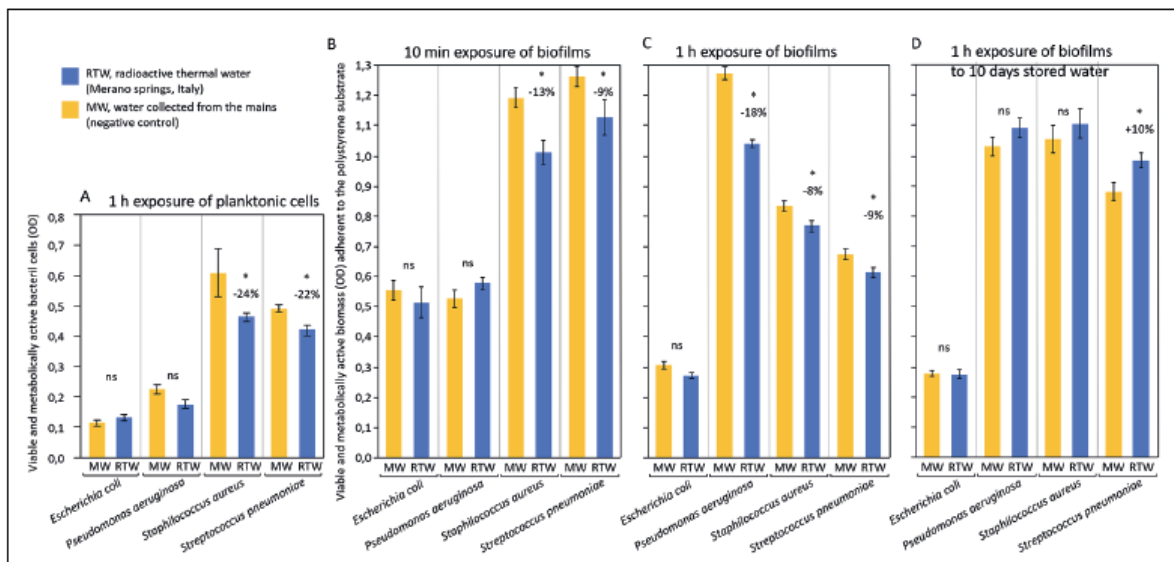
Statistische Analysen wurden mit der Software JMP 10.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten zur lebensfähigen Biomasse wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft, und die Homogenität der Varianzen wurde mit dem Levene-Test verifiziert. Mittelwerte und Standardfehler wurden aus den Rohdaten berechnet. Eine Zwei-Wege-Varianzanalyse (ANOVA) wurde durchgeführt, wobei der Mikroorganismus und das Wasser als feste Faktoren berücksichtigt wurden. Als Post-hoc-Test wurde der Tukey-Test für ehrliche Signifikanz verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

**Ergebnisse**

**Untersuchung der lebensfähigen Biomasse (MTT-Assay)**

Die Ergebnisse in Bezug auf die Wirkung von RTW auf planktonische Zellen sind in Abbildung 2A dargestellt. Beide Faktoren zeigten einen hochsignifikanten Einfluss auf die Zellebensfähigkeit, und es wurde keine Wechselwirkung zwischen ihnen festgestellt. Eine signifikante Abnahme der Zellebensfähigkeit nach Exposition mit RTW wurde für *S. aureus* und *S. pneumoniae* nachgewiesen (24%,  $p=0,002$ , bzw. 22%,  $p=0,039$  im Vergleich zur MW-Kontrolle). Für die anderen beiden getesteten Mikroorganismen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Die Wirkung von RTW auf Biofilme nach einer Exposition von 10 min und einer Stunde ist in Abbildung 2B bzw. 2C dargestellt. Nach einer 10-minütigen Exposition zeigte die ANOVA, dass beide Faktoren die Biofilmbildung signifikant beeinflussten, und es gab eine signifikante Wechselwirkung zwischen ihnen ( $p=0,022$ ).



**Abbildung 2.** Die Ergebnisse des Assays zur lebensfähigen Biomasse sind in der Grafik als Mittelwerte  $\pm$  1 SE angegeben. A, Untersuchung der RTW-Wirkung auf Bakterienzellen in der planktonischen Phase; B, Untersuchung der RTW-Wirkung auf Biofilme nach einer 10-minütigen Exposition oder nach einer einstündigen Exposition (C); D, Untersuchung der Restwirkung eines zehn Tage gelagerten RTW auf Biofilme nach einer einstündigen Exposition. Die Ergebnisse der statistischen Analyse werden als [ns] = nicht-signifikante Unterschiede zwischen dem getesteten und dem Kontrollwasser ( $p > 0,05$ ) ausgewiesen, oder [\* ,  $\pm xx\%$ ] = ein signifikanter Unterschied ist markiert, und der Prozentsatz der Abnahme oder Zunahme der bakteriellen Lebensfähigkeit der RTW-behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle wird dargestellt.

Eine signifikante Abnahme der Zellebensfähigkeit nach Exposition mit RTW wurde für *S. aureus* und *S. pneumoniae* nachgewiesen (13%,  $p < 0,001$ , bzw. 9%,  $p = 0,019$  im Vergleich zur MW-Kontrolle).

Nach einstündiger Exposition zeigte die ANOVA, dass beide Faktoren die Biofilmbildung signifikant beeinflussten; zudem gab es eine signifikante Wechselwirkung zwischen ihnen ( $p < 0,001$ ). Eine signifikante Abnahme der Zellebensfähigkeit nach Exposition mit RTW wurde für *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* nachgewiesen (8%,  $p < 0,001$ , 9%,  $p = 0,037$ , bzw. 18%,  $p < 0,001$  im Vergleich zur MW-Kontrolle).

Die Wirkung von 10 Tage gelagertem RTW auf Biofilme (einstündige Exposition) ist in Abbildung 2D dargestellt. Es wurde ein signifikanter Einfluss des Mikroorganismus-Faktors festgestellt ( $p < 0,001$ ), während der Wasser-Faktor

nicht signifikant war ( $p = 0,072$ ); es gab keine Wechselwirkung zwischen den Faktoren ( $p = 0,442$ ). Eine signifikante Zunahme der Zellebensfähigkeit nach Exposition mit RTW wurde für *S. pneumoniae* nachgewiesen (10%,  $p = 0,026$ , verglichen mit der Kontrolle).

### **Morphologische Analyse (REM)**

Die morphologischen Eigenschaften der mit den getesteten Mikroorganismen infizierten und mit RTW und MW exponierten RHRE sind in Abbildung 3 dargestellt. Alle Beobachtungen zeigten eine bakterielle Adhärenz und Kolonisation, die eine besondere Affinität zu den Zilien des Epithels aufwies. Die bakterielle Infektion verursachte signifikante Veränderungen in der Epithelstruktur, die sich in einer Vergrößerung der interzellulären Räume und einer Schädigung der Zellstruktur selbst zeigte. Mit *S. aureus* infizierte Proben zeigten nach der Behandlung mit RTW im Vergleich zur MW-Kontrolle eine etwas geringere Kolonisation, was mit den Daten zur lebensfähigen Biomasse übereinstimmt. Es wurden keine Einflüsse von RTW auf die Besiedlung mit anderen Mikroorganismen gefunden. Es wurden auch keine Einflüsse von RTW auf die nicht-infizierten RHRE-Proben gefun-

den, die alle eine vollständige Erhaltung der anatomischen Merkmale aufwiesen.

### **Diskussion**

Das Atemwegsepithel ist eine komplexe Schnittstelle zur äußeren Umgebung, die immer wieder durch Krankheitserreger, aber auch durch Allergene und Schadstoffe herausgefordert wird<sup>20</sup>. Die Infektion der Atemwege ist eng mit biofilmbildenden pathogenen Mikroorganismen verbunden. Dieses Merkmal beinhaltet die Beschränkung der Bakterien auf einen bestimmten Ort und die Möglichkeit, der Abtötung durch eine Antibiotikatherapie zu widerstehen, obwohl die Bakterienzellen in der planktonischen Phase empfindlich auf die Antibiotika reagieren<sup>10</sup>. Daher wird dieses Phänomen oft mit der Chronifizierung von Biofilm-assoziierten Infektionen in Verbindung gebracht. Zur Behandlung von chronischen Infektionen der Atemwege

kann die Inhalation von Thermalwasser eingesetzt werden. Aufgrund der Unsicherheit über die Indikationen und Wirkmechanismen gibt es jedoch keine aktuellen Richtlinien<sup>27</sup>.

Zusammensetzung, Eigenschaften und mögliche Indikationen der Thermalwässer, einschließlich radioaktiver Wässer, sind im Allgemeinen gut bekannt. Dennoch gibt es keine Daten über die Wirkung von RTW auf Biofilme und Biofilm-assoziierte Atemwegsinfektionen.

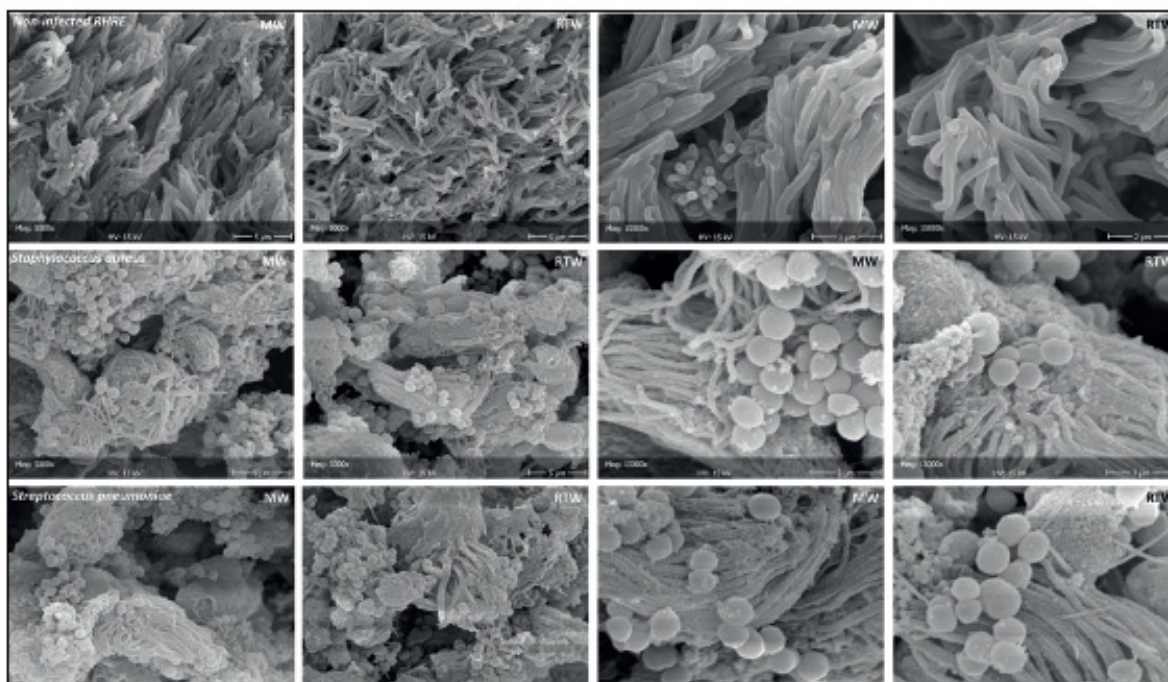
Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass das getestete RTW in der Lage war, die Zellebensfähigkeit von planktonischen Kulturen einiger der häufigsten mit Atemwegsinfektionen assoziierten Erreger signifikant zu reduzieren. Die Abnahme war stammabhängig, und die Wirkung des RTW war signifikant bei grampositiven Bakterien (*S. aureus*, *S. pneumoniae*), aber nicht bei Gram-negativen (*P. aeruginosa*, *E. coli*). Das getestete Wasser reduzierte auch die Biofilm-Lebensfähigkeit der gleichen Mikroorganismen auf einem Standard-Polystyrol-Substrat nach 10-minütiger Exposition. Eine verlängerte Exposition (eine Stunde) zeigte ebenfalls eine Abnahme der Lebensfähigkeit von *P. aeruginosa*.

sa-Biofilmen. Daher wurde die Nullhypothese verworfen, dass RTW im Vergleich zu Leitungswasser (MW) keine signifikanten Unterschiede in der Anti-Biofilm-Wirkung zeigt.

Interessanterweise zeigte sich bei einem erneuten Test des RTW nach zehntägiger Lagerungszeit kein reduzierender Effekt auf die Lebensfähigkeit des Biofilms. Das letztgenannte Experiment zeigte, dass die antibiofilmische Wirkung des getesteten Thermalwassers mit der Zeit verschwand, was auf einen Zusammenhang mit seiner Radioaktivität schließen lässt.

Es wurde kein Effekt des RTW auf das rekonstituierte menschliche respiratorische Epithel (RHRE) festgestellt. Vielmehr zeigten die mit *S. aureus* infizierten Proben nach der Behandlung mit dem RTW im Vergleich zum Kontrollwasser eine etwas geringere Biofilmbildung.

Die Möglichkeit der In-vitro-Züchtung von RHRE ist eine sehr vielversprechende Möglichkeit, um die klinischen Bedingungen realistisch nachzubilden. Studien zur Wirksamkeit neuartiger Medikamente oder Substanzen, deren Wirkung auf menschliches Gewebe unbekannt ist, sind nur ein Beispiel dafür<sup>31</sup>. Ein Nachteil dieses Systems besteht jedoch darin, dass bestimmte Bedingungen, wie z. B. allergische Rhinitis oder andere chronische Erkrankungen, noch nicht adäquat repliziert werden können. In der vorliegenden Studie wurde ein Modell einer bakteriellen Infektion der Atemwege durch die erfolgreiche Entwicklung von Biofilmen auf dem RHRE simuliert. Mit diesem Modell war es möglich, die Wirksamkeit einer Behandlung unter Bedingungen zu testen, die den klinischen so nahe wie möglich kommen. In diesem Fall konnten sich die Nachweismethoden nicht auf denselben As-



**Abbildung 3.** REM-Analyse des RHRE-Modells. Nicht infizierte Epithelien wiesen eine vollständige Erhaltung der anatomischen Merkmale auf. Es wurden keine Einflüsse der Exposition gegenüber RTW auf die nicht infizierten RHRE-Proben festgestellt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Infektion des RHRE durch die getesteten grampositiven Bakterien. Alle Beobachtungen zeigten eine bakterielle Adhärenz und Kolonisation, die eine besondere Affinität zu den Zilien des Epithels aufwies. Die bakterielle Infektion verursachte signifikante Veränderungen in der Epithelstruktur, die sich in einer Vergrößerung der interzellulären Räume und einer Schädigung der Zellstruktur selbst zeigte. Mit *S. aureus* infizierte Proben zeigten nach der Behandlung mit RTW im Vergleich zur MW-Kontrolle eine etwas geringere Kolonisation, was mit den Daten zur lebensfähigen Biomasse übereinstimmt. Es wurden keine Einflüsse von RTW auf die Infektion durch die anderen getesteten Mikroorganismen gefunden (mikroskopische Aufnahmen nicht dargestellt).



say für lebensfähige Biomasse (MTT) stützen, da die Reaktion sowohl von menschlichen Zellen als auch von Bakterien ausgegangen wäre. Daher wurde beschlossen, die bakteriellen Interaktionen mit dem RHRE sowie die Wirkung der getesteten Behandlung auf dieses Modell mit einem morphologischen Ansatz (REM) zu untersuchen. Dieser Ansatz zeigte die Kolonisation des Epithels durch die getesteten Bakterienstämme, mit einer besonderen Affinität zu den Zilien des Epithels, mit einer morphologischen Betrachtung, die eine hohe Ähnlichkeit mit der klinischen aufweist. Die bakterielle Kolonisation des Epithels verursachte signifikante Veränderungen in seiner Struktur, die sich in einer Vergrößerung der interzellulären Räume und einer Schädigung der Zellstruktur selbst zeigte.

Der Wirkmechanismus von  $^{222}\text{Rn}$  auf das menschliche Atemwegsgewebe ist nicht vollständig geklärt<sup>26</sup>. Eine Verstärkung der antioxidativen Aktivität und Unterdrückung der Immunantwort wurde vorgeschlagen und ist allgemein anerkannt<sup>25,26</sup>. Die Eigenschaften dieses Elements, einschließlich seiner Liposolubilität, wurden mit seinen Wechselwirkungen mit den lipidischen Komponenten der Zellmembran und der Bakterienzellwand in Beziehung gesetzt. In der Literatur gibt es fast keine Informationen über die Wirkung von  $^{222}\text{Rn}$  auf Bakterienzellen. Serrano et al.<sup>26</sup> stellten die Hypothese auf, dass die Wechselwirkung dieses Elements mit den Lipiden der Bakterienmembran das Bakterienwachstum beeinflussen könnte. Unsere Ergebnisse könnten zusätzliche Erkenntnisse liefern, da die Wirkung von  $^{222}\text{Rn}$  nur auf grampositive planktonische Zellen gezeigt wurde. Es ist bekannt, dass grampositive Bakterien eine dicke Zellwand aus Peptidoglykanen besitzen; im Gegensatz dazu weisen gramnegative Zellen eine wesentlich dünnere Struktur auf. Es kann vermutet werden, dass eine dickere Zellwand eine höhere Menge an  $^{222}\text{Rn}$ -Partikeln aufnehmen kann, die wiederum eine höhere Aktivität auf diesen Zellen im Vergleich zu gramnegativen Zellen entfalten. In der Literatur wurde die Wirkung von Strahlung auf Bakterien unter Berücksichtigung der Elemente  $^{239}\text{Pu}$  und  $^{237}\text{Np}$ <sup>19</sup>

untersucht, die eine ähnliche Art von Strahlung wie  $^{222}\text{Rn}$  ( $\alpha$ -Teilchen) emittieren. Im Gegensatz zu den anderen Strahlungstypen, die sehr durchdringend sind und ihre Energie entlang ihres Weges im Verhältnis zur Dichte der Materialien abgeben, haben  $\alpha$ -Teilchen eine geringe Durchdringungskraft. Dadurch verursachen sie einen relativ hohen Schaden, der typischerweise auf wenige Zehn  $\mu\text{m}$  in Geweben beschränkt ist<sup>19</sup>. Reed et al.<sup>32</sup> zeigten, dass ein  $\alpha$ -Partikel-Strahler,  $^{239}\text{Pu}$ , eine größere Abnahme der bakteriellen Lebensfähigkeit von *Chelatobacter heintzii* im Vergleich zu  $\gamma$ -Strahlung verursachte. Die Autoren führten diese Aktivität auf die Bioassoziation von  $^{239}\text{Pu}$  mit den Bakterienkolonien zurück. Dieser Mechanismus könnte die Wirkung von  $^{222}\text{Rn}$  auf Biofilme erklären, die in der vorliegenden Studie aufgezeigt wurde.

Anhand des Modells mit infiziertem RHRE konnte die therapeutische Wirkung der getesteten RTW unter kontrollierten Bedingungen bewertet werden, die den In-vivo-Bedingungen sehr ähnlich sind. Dennoch sind In-vivo-Studien weiterhin notwendig, da In-vitro-Simulationen, so genau sie auch sein mögen, nur einen Teil der sehr komplexen Wechselwirkungen abbilden können, die in den menschlichen Atemwegen stattfinden. Es ist eine Gratwanderung zwischen Geschwindigkeit, Kosten und Zweck des Modells, die seine Auswahl und Verwendung bestimmt.

## Schlussfolgerungen

Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, eine Assoziation der Wirkung von RTW mit antibiotischen Therapien zu testen, die konventionell gegen Biofilm-assoziierte Atemwegsinfektionen durchgeführt werden. Die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber den antibiotischen Wirkstoffen könnte durch diese Assoziation moduliert werden, was möglicherweise deren Wirksamkeit erhöht und Nebenwirkungen reduziert.

---

### Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass sie keine Interessenkonflikte haben.

---

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Dr. Lo Cunsolo für die Hilfe bei der RTW-Probenahme und den Radioaktivitätsmessungen.

---

### Finanzierung

Die vorliegende Untersuchung wurde zum Teil von Terme Meran AG (Italien) finanziert, die jedoch keine Rolle bei der Planung und Durchführung des Experiments, der Datenerfassung und -analyse sowie dem Verfassen dieses Artikels gespielt hat.

### Referenzen

- 1) Manikandan CA, Amsath A. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with respiratory tract infections. *Int J Pure Appl Zool* 2013; 1: 61-69.
- 2) Riley C, Riley S. Influenza and pneumococcal disease in the community. *Nurs Stand* 2003; 18: 4551; quiz 52, 55.
- 3) Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ* 2008; 86: 408-416.
- 4) Bellussi LM, Passali FM, Ralli M, De Vincentiis M, Greco A, Passali D. An overview on upper respiratory tract infections and bacteriotherapy as innovative therapeutic strategy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 27-38.
- 5) Passali D, Passali GC, Vesperini E, Cocca S, Visconti IC, Ralli M, Bellussi LM. The efficacy and tolerability of *Streptococcus salivarius* 24SMB and *Streptococcus oralis* 89a administered as nasal spray in the treatment of recurrent upper respiratory tract infections in children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 67-72.
- 6) Vickery K, Hu H, Jacombs AS, Bradshaw DA, Deva AK. A review of bacterial biofilms and their role in device-associated infection. *Healthc Infect* 2013; 18: 61-66.
- 7) Tarantino V, Saiva V, D'Agostino R, Silvestri M, Passali FM, Di Girolamo S, Ciprandi G. Bacteriotherapy in children with recurrent upper respiratory tract infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 39-43.
- 8) Finch RG. Antibiotic resistance: a view from the prescriber. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 989-994.
- 9) Ascione T, Balato G, Mariconda M, Fantoni M, Giovannenze F, Pagliano P. Clinical and prognostic features of prosthetic joint infections caused by *Enterococcus* spp. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 59-64.
- 10) Morris DP. Bacterial biofilm in upper respiratory tract infections. *Curr Infect Dis Rep* 2007; 9: 186192.
- 11) Hamilos DL. Biofilm formations in pediatric respiratory tract infection: Part 1: biofilm structure, role of innate immunity in protection against and response to biofilm, methods of biofilm detection, pediatric respiratory tract diseases associated with mucosal biofilm formation. *Curr Infect Dis Rep* 2019; 21: 6.
- 12) Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H* 2014; 228: 1083-1099.
- 13) Pintucci JP, Corno S, Garotta M. Biofilms and infections of the upper respiratory tract. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14: 683-690.
- 14) Guilhen C, Forestier C, Balestrino D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. *Mol Microbiol* 2017; 105: 188-210.
- 15) Ajrouche R, Ielsch G, Clero E, Rou-

dier C, Gay D, Guillevic J, Laurier D, Le Tertre A. Quantitative health risk assessment of indoor radon: a systematic review. *Radiat Prot Dosimetry* 2017; 177: 69-77.

16) Przylibski TA, Domin E, Gorecka J, Kowalska A. <sup>222</sup>Rn concentration in groundwaters circulating in granitoid massifs of Poland. *Water* 2020; 748: 1-16.

17) Chen J, Harley NH. A review of indoor and outdoor radon equilibrium factors-part I: <sup>222</sup>Rn. *Health Phys* 2018; 115: 490-499.

18) Ghernaout D. Aeration process for removing radon from drinking water – A review. *Appl Eng* 2019; 3: 32.

19) MacaskieaaJon LE, Lloydbb R. Microbial interactions with radioactive wastes and potential applications. In: Elsevier, ed. *Radioactivity in the Environment*, 2002; pp. 343-381.

20) Passali D, De Corso E, Platzgummer S, Streitberger C, Lo Cunsolo S, Nappi G, Passali GC, Bellussi L. Spa therapy of upper respiratory tract inflammations. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 270: 565-570.

21) Passali D, Gabelli G, Passali GC, Magnato R, Platzgummer S, Salerni L, Lo Cunsolo S, Joos A, Bellussi LM. Radioactive Merano SPA treatment for allergic rhinitis therapy. *Int J Otolaryngol* 2016; 2016: 2801913.

22) Keller S, Konig V, Mosges R. Thermal water applications in the treatment of upper respiratory tract diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Allergy (Cairo)* 2014; 2014: 943824.

23) De Benedetto M, Arigliani M, Ballacchino A, Cassano P, Toraldo DM, Ralli M, Passali FM, Passali D. Obstructive sleep apnea syndrome in the pediatric age: the role of the otorhinolaryngologist. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 3-8.

24) Toraldo DM, Di Michele L, Ralli M, Arigliani M, Passali GC, De Benedetto M, Passali D. Obstructive sleep apnea syndrome in the pediatric age: the role of the

pneumologist. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 15-18.

25) Yamaoka K, Mitsunobu F, Hanamoto K, Shibuya K, Mori S, Tanizaki Y, Sugita K. Biochemical comparison between radon effects and thermal effects on humans in radon hot spring therapy. *J Radiat Res* 2004; 45: 83-88.

26) Serrano C, Romero M, Alou L, Sevilano D, Corvillo I, Armijo F, Maraver F. Survival of human pathogenic bacteria in different types of natural mineral water. *J Water Health* 2012; 10: 400405.

27) Thomas M, Yawn BP, Price D, Lund V, Mullol J, Fokkens W, European Position Paper on R, Nasal Polyps G. EPOS Primary Care Guidelines: European Position Paper on the Primary Care Diagnosis and Management of Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2007 – a summary. *Prim Care Respir J* 2008; 17: 79-89.

28) Brambilla E, Ionescu AC, Cazaniga G, Ottobelli M, Samaranayake LP. Levorotatory carbohydrates and xylitol subdue *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *J Basic Microbiol* 2016; 56: 480492.

29) I o n e s c u A C , V e z z o - l i E, Conte V, Procacci P, Garcia-Godoy F, Brambilla E. Effects of Na-DNA mouthwash solutions on oral soft tissues. A bio-reactor-based reconstituted human oral epithelium model. *Am J Dent* 2020; 33: 277-284.

30) Gomes IB, Meireles A, Goncalves AL, Goeres DM, Sjollema J, Simoes LC, Simoes M. Standardized reactors for the study of medical biofilms: a review of the principles and latest modifications. *Crit Rev Biotechnol* 2018; 38: 657-670.

31) Bishop E, Haswell L, Adamson J, Costigan S, Thorne D, Gaca M. An approach to testing undiluted e-cigarette aerosol in vitro using 3D reconstituted human airway epithelium. *Toxicol In Vitro* 2019; 54: 391-401.

32) Reed DT, Vojta Y, Quinn JW, Richmann MK. Radiotoxicity of plutonium in NTA-degrading *Chelatobacter heintzii* cell suspensions. *Biodegradation* 1999; 10: 251-260.