

Aus dem Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation,
FFoQSI GmbH, Tulln und der Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie und dem Institut für
Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin,
Veterinärmedizinischen Universität Wien

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dipl.ECVPH Martin Wagner)

Analyse von Wischproben von Lebensmittelkontaktflächen aus der Käseproduktion auf das Vorhandensein von Biofilmen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Felicitas Soriat

Wien, im April 2023

Betreuerin:

Mag^a med.vet. Viktoria Neubauer, PhD

Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety, and Innovation, FFoQSI GmbH, Tulln

Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie,

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin,

Veterinärmedizinische Universität Wien

Zweitbetreuerin:

Eva Maria Voglauer, PhD

Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety, and Innovation, FFoQSI GmbH, Tulln

Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie,

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin,

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter:

Priv.-Doz. Dr. med. vet. Igor Loncaric

Institut für Mikrobiologie,

Abteilung für Pathobiologie,

Veterinärmedizinische Universität Wien

Förderhinweis

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsvorhabens des Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety und Innovation (FFoQSI) erstellt. Das COMET-K1 Kompetenzzentrum FFoQSI wird im Rahmen von COMET – Competence Centers for Excellent Technologies durch die österreichischen Bundesministerien BMK, BMDW und die Bundesländer Niederösterreich, Oberösterreich und Wien gefördert. Das Programm COMET wird durch die FFG abgewickelt. Die strategischen Zielsetzungen von COMET sind der Aufbau neuer Kompetenzen durch die Initiierung und Unterstützung einer langfristig ausgerichteten Forschungszusammenarbeit zwischen Wissenschaft und Wirtschaft auf höchstem Niveau sowie der Aufbau und die Sicherung der Technologieführerschaft von Unternehmen. Durch die Weiterentwicklung und Bündelung existierender Stärken und die Einbindung von internationalem Forschungs-Know-how soll der Forschungsstandort Österreich nachhaltig gestärkt werden.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, den 19.04.2023

Felicitas Soriat

ZUSAMMENFASSUNG

Biofilme sind Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen, eingebettet in einer Matrix aus selbstproduzierten extrazellulären polymeren Substanzen, welche hauptsächlich aus Kohlenhydraten, Proteinen und extrazellulärer DNA bestehen. Durch die schützende Matrix erlangen Biofilm-assoziierten Bakterien zahlreiche Vorteile für ihr Überleben, wie beispielsweise Schutz vor Austrocknung, Biozide, UV-Strahlung, toxischen Metallen, einigen Antibiotika und Protozoen. Daher sind Biofilme nach ihrer Entstehung nur schwer wieder zu entfernen und können durch mikrobiellen Verderb von Lebensmitteln zu wirtschaftlichen Verlusten führen oder durch die Ansammlung von pathogenen Bakterien die Gesundheit der Menschen gefährden. Die Milchindustrie beherbergt zahlreiche Orte mit nährstoffreichen Umgebungen, welche optimale Bedingungen für Biofilmbildung bieten. In der vorliegenden Arbeit wurden in einer österreichischen Molkerei unterschiedliche Stellen, sowohl produktberührende als auch nicht-produktberührende Oberflächen, nach der Reinigung und Desinfektion beprobt und auf das Vorhandensein von Biofilmen untersucht. Dieselbe Molkerei wurde bereits im Oktober 2020 auf Biofilme untersucht, und es wurden Einzelmaßnahmen an jenen Stellen ergriffen, welche als Biofilm-positiv identifiziert werden konnten. Daher stellt diese Arbeit eine Nachbeprobung dar, um nun die Effizienz dieser Einzelmaßnahmen zu überprüfen. Die Proben wurden mittels Zellschaber und Tupfer entnommen. Die extrahierte bakterielle DNA wurde mittels quantitativer PCR analysiert, um die Bakteriendichte zu bestimmen. Die Bestandteile der Matrix wurden wie folgt analysiert beziehungsweise quantifiziert: die konzentrierten Kohlenhydrate mittels Phenol-Schwefelsäure-Test, die präzipitierte extrazelluläre DNA mittels Spektrophotometer und die ausgefällten Proteine mittels Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung. In einer von 22 Proben konnten bakterielle DNA und alle drei Matrixkomponenten, und somit ein Biofilm, nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um eine nicht-produktberührende Probe vom Klimagerät der Molkerei. Allerdings konnten neben dem Klimagerät, zuvor positive Biofilm-Stellen aus dem Jahr 2020, nun in der vorliegenden Arbeit als Biofilm-negativ identifiziert werden. Somit konnte die Arbeit zeigen, dass die ergriffenen Einzelmaßnahmen an den anderen untersuchten Stellen wirksam waren. Weiterhin muss jedoch besonderes Augenmerk auf die Klimageräte als potentielle Kreuzkontaminationsquellen gelegt werden.

ABSTRACT

Biofilms are communities of microorganisms embedded in a matrix of self-produced extracellular polymeric substances, which mainly consist of carbohydrates, proteins, and extracellular DNA. Due to the protective matrix, biofilm-associated bacteria gain several advantages for their survival, such as protection against dehydration, biocides, UV radiation, toxic metals, some antibiotics, and protozoa. For this reason, biofilms are difficult to remove once they have established and can lead to economic losses through microbial spoilage of food or endanger human health by accumulating pathogenic bacteria. The dairy industry provides numerous sites with nutrient-rich environments, which offer optimal conditions for biofilm formation. In this study, different locations of the production in an Austrian dairy, both product-contact and non-product-contact surfaces, were sampled and analysed for the presence of biofilms after cleaning and disinfection. The same dairy was previously sampled and examined for biofilms in October 2020, and individual measures were taken at locations identified as biofilm-positive. Therefore, this study represents a follow-up sampling to verify the effectiveness of these individual measures. The samples were collected using cell scrapers and swabs. The extracted bacterial DNA was analysed using quantitative PCR to determine bacterial density. The components of the matrix were analysed or quantified as follows: concentrated carbohydrates using the phenol-sulfuric acid test, precipitated extracellular DNA using a spectrophotometer, and precipitated proteins using gel electrophoresis and subsequent silver staining. In one of 22 samples, bacterial DNA and all three matrix components, and thus a biofilm, could be detected. This was a non-product-contact sample from the dairy's air conditioning unit. However, in addition to the air conditioner, previously identified biofilm-positive sites from 2020 were now identified as biofilm-negative in the present study. Thus, the study demonstrates that the individual measures taken at the other examined locations were effective. However, special attention must be paid to air conditioning units as potential sources of cross-contamination.

Abkürzungsverzeichnis

EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
QS	Quorum-Sensing
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Echerichia coli</i>
spp.	Spezies (Plural)
RpoS	RNA Polymerase Sigma-Faktor
CIP	Cleaning in Place (ortsgebundene Reinigung)
QAV	quartäre Ammoniumverbindungen
NK	Negativkontrolle
CER	Cation Exchange Resin (Ionenaustauschharz)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
PBS	Phosphat Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
bce	bacterial cell equivalents (bakterielle Kopienanzahl)
SD	Standardabweichung
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
HCl	Chlorwasserstoff
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
TEMED	Tetramethylethylenediamin
UHQ	Ultra High Quality (Ultrahohe Qualität)
PTFE	Polytetrafluorethylen
VBNC	viable but nonculturable (lebensfähige, aber nicht kultivierbare Bakterien)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1.	BEDEUTUNG VON BIOFILMEN.....	1
1.2.	DEFINITION BIOFILME.....	2
1.2.1.	Biofilmbildung	2
1.2.2.	Die extrazelluläre Matrix	5
1.2.3.	Eigenschaften und Funktionen der Matrix.....	7
1.3.	PROBLEMATIK VON BIOFILMEN IN DER LEBENSMITTELINDUSTRIE	8
1.3.1.	Relevante Biofilm-bildende Bakterien in der Lebensmittelindustrie	9
1.4.	PROBLEMATIK VON BIOFILMEN IN DER MILCHINDUSTRIE.....	10
1.5.	REINIGUNG UND DESINFEKTION VON BIOFILMEN.....	11
1.5.1.	Desinfektionsmittel	12
1.5.2.	Alternative Methoden.....	13
1.6.	ZIEL DIESER ARBEIT	14
2.	MATERIAL UND METHODIK	15
2.1.	PROBENPROZESSIERUNG.....	15
2.1.1.	Probennahme	15
2.1.2.	Probenvorbereitung	17
2.2.	NACHWEIS VON BAKTERIELLER DNA	18
2.2.1.	Prozessierung des Pellets und DNA-Extraktion	18
2.2.2.	Quantitative PCR.....	18
2.3.	MATRIX-ANALYSE.....	19
2.3.1.	Kohlenhydrat-Analyse	19
2.3.2.	Extrazelluläre DNA-Analyse	21
2.3.3.	Protein-Analyse	22
2.4.	DATENAUSWERTUNG	25
3.	ERGEBNISSE.....	26

3.1.	BAKTERIELLE DNA	26
3.2.	MATRIX	26
3.2.1.	Kohlenhydrate	26
3.2.2.	Extrazelluläre DNA	27
3.2.3.	Proteine	27
3.3.	INKLUSIONSKRITERIEN UND ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	29
4.	DISKUSSION	32
5.	LITERATURVERZEICHNIS	39
6.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	44

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Bedeutung von Biofilmen

In der Geschichte der Mikrobiologie wurden Mikroorganismen, die sich vereinigen und gemeinsam in einer selbst hergestellten Matrix auf Oberflächen oder Geweben leben, bereits in den Jahren 1683–1708 von Anthony van Leeuwenhoek beschrieben. Im darauffolgenden Jahrhundert blieben Biofilme eher ein Randgebiet der mikrobiologischen Forschung. Eine der ersten wichtigen Beobachtungen in Bezug auf Biofilme war vor ca. 90 Jahren im Sinne von *Biofouling*, eine unerwünschte Ablagerung von Mikroorganismen an technischen Oberflächen, wie zum Beispiel Schiffsrümpfen (1). Heute weiß man jedoch, dass Biofilme in der Umwelt ubiquitär vorkommen und in vielen Bereichen von großer Bedeutung sind, sei es für Umweltprozesse, in der Medizin oder für das öffentliche Gesundheitswesen. Das Wissen um ihre Existenz hat in den letzten Jahrzehnten an Wichtigkeit gewonnen (2). Dies hat auch einen guten Grund, denn man schätzt, dass sich insgesamt 40–80 % aller Zellen auf der Welt in Biofilmen befinden und Biofilme in allen Biotopen auf der Erdoberfläche, außer in den Ozeanen, dominieren (3). Biofilme werden heute nicht nur als störend angesehen, sondern bringen auch vorteilhafte Aspekte mit sich. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Selbstreinigung von Böden, Sedimenten und Gewässern. Des Weiteren sind sie Biofilter zur Reinigung von Trinkwasser. Weitere biotechnologische Anwendungen finden Biofilme in der Abwasserbehandlung, als Katalysatoren in der biologischen Abfallentsorgung sowie in der Produktion von Feinchemikalien und Biokraftstoffen (4). Bestimmte Biofilme werden für die Produktion von Enzymen verwendet, die für die Verarbeitung von Textilien, Lebensmitteln, Wäsche, Papier und Zellstoff von Bedeutung sind (5). Andererseits können sie jedoch auch gesundheitsgefährdend für Menschen werden, wenn sie sich z.B. in Wasserrohrleitungen ansiedeln und sich danach pathogene Keime anlagern, was zu einer Wasserverschmutzung führen kann (2). Biofilme sind auch häufig der Grund für Infektionen des Bewegungsapparates durch Ansiedelung auf Prothesen, toten Knochen (Sequester) und Implantaten (6). Daneben gewinnen auch chronische Biofilminfektionen aufgrund der höheren Resistenz gegenüber antimikrobiellen Mitteln und dem Immunsystem immer größere Bedeutung (7). Im öffentlichen Gesundheitswesen werden Biofilme auf Oberflächen in Schlachthöfen, Molkereien, anderen Lebensmittelverarbeitungsbetrieben und landwirtschaftlichen Betrieben zur Problematik (8).

1.2. Definition Biofilme

Unter Biofilmen versteht man Bakterienzellen von verschiedenen oder gleichen Bakterienarten, die sich zu strukturierten mikrobiellen Gemeinschaften zusammenschließen und in einer selbst hergestellten Matrix, bestehend aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), eingebettet sind (9). Dieser Zusammenschluss dient einer Vielzahl an Eigenschaften (Interaktionen, Cross-Feeding, erhöhte Toleranz, erhöhte Genaustauschrate), über welche Bakterien mit ihrer ursprünglichen planktonischen Form nicht verfügen (10). Daher besitzen Biofilm-assoziierte Bakterien eine höhere Resistenz gegenüber Antibiotika, Reinigungs- und Desinfektionsmitteln und wechselnden Umweltbedingungen. Mit der Biofilmbildung wird eine Erhöhung der Überlebensfähigkeit von einzelnen Mikroorganismen erlangt. Somit stellen Biofilme Nischen zugunsten der Biodiversität von Mikroorganismen dar (11). Biofilme existieren fast überall und können unbelebte sowie belebte Oberflächen bewohnen. Sie zeigen Unterschiede in ihrer Genexpression, Wachstumsrate und ihrem Phänotyp auf (12). Biofilme können beispielsweise durch Scherkräfte eine phänotypische Anpassung erfahren und abhängig von den Kräften, sowohl einer elastischen reversiblen als auch einer irreversiblen Verformung unterliegen (11).

1.2.1. Biofilmbildung

Die Biofilmbildung ist ein mehrstufiger und komplexer Entstehungsprozess, der Bakterien den Übergang von einer freischwimmenden zu einer sesshaften Form ermöglicht. Für die Anheftung und die darauffolgende Entstehung eines Biofilms sind verschiedene Faktoren ausschlaggebend. Zu den bedeutendsten Faktoren gehören Oberflächeneigenschaften, Umweltfaktoren, umgebendes Medium, die Bakterienzelle selbst und Stressoren. Zu den Oberflächeneigenschaften zählen zum Beispiel Hydrophobie, elektrostatische Aufladung, Struktur/Rauigkeit, Topografie, konditionierender Film und das Material der Oberfläche (5,12–14). Einige Beispiele für die Umweltfaktoren sind Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit und die Wasserverfügbarkeit. Weiters spielt das umgebende Medium eine wichtige Rolle mit der Strömungsgeschwindigkeit, dem pH-Wert, der Nährstoffverfügbarkeit und der Nährstoffzusammensetzung (5). Auch die Oberfläche des Bakteriums ist für die Anheftung von Bedeutung. Dazu gehören hydrophobe Oberflächenstrukturen wie Fimbrien, Pili, Flagellen und Lipopolysaccharide. Die EPS-Matrix-Produktion, welche mit der Menge an verfügbaren Nährstoffen korreliert, ist auch ein unverzichtbarer Bestandteil für die

Biofilmbildung, da EPS-Bestandteile den Halt der Bakterien untereinander und an der Oberfläche ermöglichen und verstärken (9). Antimikrobielle Stoffe, Nährstoffmangel und konkurrierende Bakterien sind Beispiele für Stressoren (15). Hier beschreiben einige Studien, dass z.B. bei Nährstoffmangel vermehrt Biofilme gebildet werden (16). Abbildung 1 zeigt den Entwicklungsprozess eines Biofilms, der sich grob in fünf Stadien einteilen lässt: I) Anheftung von Planktonzellen = reversible Anheftung, II) Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) = irreversible Anheftung, III) Mikrokoloniebildung, IV) Reifung und V) Dispersion (5).

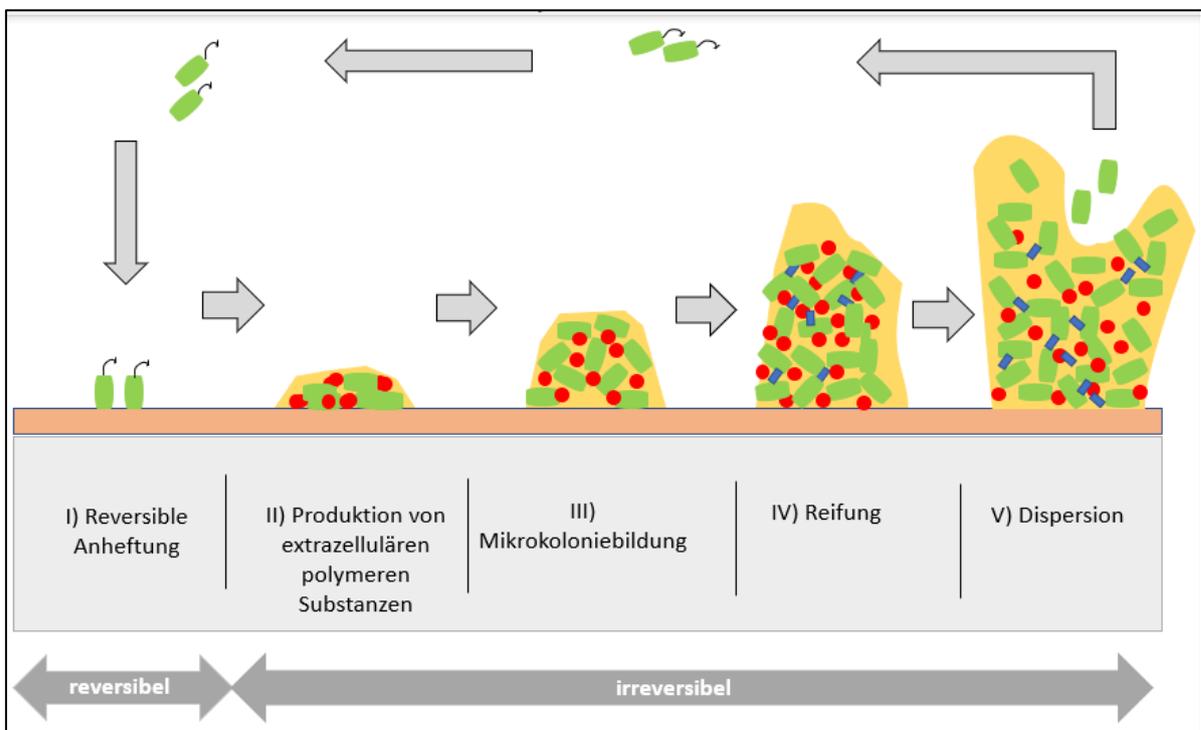


Abb. 1: Entwicklungsprozess eines Biofilms, der sich in fünf Phasen einteilen lässt: I) Anheftung von Planktonzellen = reversible Anheftung, II) Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) = irreversible Anheftung, III) Mikrokoloniebildung, IV) Reifung und V) Dispersion. Adaptiert nach Winkelströter et al. (2014).

1.2.1.1. Anheftung von Planktonzellen = reversible Anheftung

Die Biofilmbildung beginnt mit einzelnen freischwimmenden planktonischen Mikroorganismen, welche sich einer Oberfläche nähern und anheften. In dieser Phase

können sich die Bakterienzellen jedoch selbst wieder entfernen, weswegen man von der reversiblen Anheftung spricht (9,12).

1.2.1.2. Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) = irreversible Anheftung

Dieses Stadium der Biofilmbildung führt zu einer Veränderung der Genexpression der angehefteten Bakterienzellen. Aufgrund dieser genetischen Veränderung unterscheiden sich die Biofilm-assoziierten Bakterien von ihrer ursprünglichen planktonischen Form in ihrem Phänotyp. Der Schlüssel zur Biofilmbildung liegt in dieser phänotypischen Veränderung und ist die Voraussetzung für einen längeren Lebenszyklus. Mit der Veränderung der Genexpression wird die EPS-Synthese der Bakterien stimuliert und die Matrix, welche den Übergang in die irreversible Anheftung darstellt, hergestellt. Die Bindung der Zellen untereinander und zur Oberfläche wird durch die EPS-Produktion verstärkt (9,11,17).

1.2.1.3. Mikrokoloniebildung

Kurze Zeit nach der erfolgreichen Anheftung beginnen sich die Bakterien zu vermehren und in ihrer selbst produzierten EPS-Matrix Aggregationen in Form von Mikrokolonien zu bilden (14).

1.2.1.4. Reifung

Die Mikrokolonien entwickeln sich zu einem reifen Biofilm, bestehend aus einer komplexen dreidimensionalen Struktur, wobei die EPS-Produktion eine entscheidende Rolle für die Stabilität des Biofilms und als Schutz vor verschiedenen Belastungen spielt (11). Weiters werden Wasserkanäle und Poren etabliert und durchziehen die Zellverbände und die EPS (9). Eine weitere geeignete Kommunikationsmöglichkeit stellt Quorum-Sensing (QS, chemische Signalgebung) durch die hohe Zelldichte des Biofilms dar. Quorum-Sensing wird durch die Produktion löslicher Proteine vermittelt und ist notwendig für eine stabile, vernetzte und komplexe Biofilmarchitektur (10,18).

1.2.1.5. Dispersion

Die gebildeten Biofilme unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau. Während sich neue Bakterien anheften, lösen sich andere ab und verteilen sich in der Umgebung (9,18). Der Abbau kann entweder durch aktive (z.B. abbauende Enzyme) oder passive (z.B. physikalische Kräfte) Ablösungsmechanismen eingeleitet werden, mit dem Ziel neue Lebensräume zu bewohnen (12). Zu den Faktoren die hauptsächlich für die Streuung verantwortlich sind, zählen die ausgereifte Population, intensive Konkurrenz, Sauerstoffmangel oder Nährstoffmangel (12). Bei Nährstoffmangel kann beispielsweise ein Molekül freigesetzt werden, welches die Freisetzung von EPS-abbauende Enzymen indiziert und zur Zellablösung einiger Zellen des Biofilms führt (18). Beispiele für physikalische Kräfte sind Erosion und Scherung (12).

1.2.2. Die extrazelluläre Matrix

Die EPS, welche von Mikroorganismen produziert werden und die Matrix bilden, stellen viel mehr als den anfänglich gedachten Schleim dar. Sie sind das „Haus der Biofilmzellen“, welches die unmittelbare Umgebung der Mikroorganismen ausmacht und in welches die Mikroorganismen eingebettet sind (19). Die Konzentration, Art, Ladung, Sorptionseigenschaften, Dichte, Stabilität, Porosität (Durchlässigkeit), Kohäsion und Hydrophobizität der selbst hergestellten Substanzen bestimmen die Lebensbedingungen von Biofilm-assoziierten Zellen (11,20). Die Matrix besteht bis zu 97 % aus Wasser. Darin verteilt findet man verschiedene Arten von Biopolymeren, wie Polysaccharide, Proteine und extrazelluläre DNA, als auch verschiedene Bakterienarten (10). Die Anteile, Art und Zusammensetzung der EPS-Bestandteile können stark variieren und hängen von der Spezieszusammensetzung des Biofilms und von externen Faktoren, wie z.B. Nährstoffverfügbarkeit, ab. Alle EPS-Biopolymere sind jedoch stark hydratisiert, bilden ein dreidimensionales Netzwerk, verbinden die Zellen untereinander, vermitteln deren Haftung an Oberflächen und sichern die Stabilität des Biofilms (11). Man geht davon aus, dass Bindungspunkte zwischen den EPS-Komponenten den Zusammenhalt durch schwache physikalisch-chemische Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen, gewährleisten (10). Biofilme bestehen in den meisten Fällen nur zu 10 % aus Zellen und zu 90 % aus EPS (11). Die Untersuchung und Erstellung eines vollständigen biochemischen Profils von Proben auf EPS-Bestandteile ist leider eine erhebliche Herausforderung, da es oft schwierig ist, die EPS-Bestandteile von anderen Komponenten, wie dem Substrat oder Umweltprodukten, zu reinigen (21). Die

Zusammensetzung und Funktion der EPS-Matrix ist eine komplexe, spannende und dynamische Thematik, auf welche nun noch etwas genauer eingegangen wird.

1.2.2.1. Exopolysaccharide (Kohlenhydrate)

Einen Hauptbestandteil der EPS-Matrix stellen Exopolysaccharide mit einer Molekülmasse von 0,5 bis 2×10^6 Dalton dar. Sie kommen als lange, lineare oder verzweigte Moleküle vor. Durch eine spezifische Färbung mit Fluoreszenzmarkierten Lektinen oder Antikörpern und durch mikroskopische Techniken können Exopolysaccharide analysiert, differenziert und dargestellt werden. Die Polysaccharide lassen sich in Homopolysaccharide und Heteropolysaccharide unterteilen, wobei der Anteil an Heteropolysacchariden überwiegt. Ein Beispiel für ein Homopolysaccharid ist Zellulose. Heteropolysaccharide bestehen aus neutralen und/oder geladenen Zuckerresten, wie z.B. Xanthan und Alginat. Letzteres ist eines der am besten erforschten Heteropolymere. Polysaccharide sind unerlässlich für die Bildung eines reifen Biofilms. Dies haben Versuche mit Mutanten gezeigt. Außerdem sind sie für die mechanische Stabilität des Biofilms von großer Bedeutung (11).

1.2.2.2. Proteine

Grob lassen sich die Proteine in zwei Gruppen einteilen, und zwar in Enzyme und Strukturproteine. Enzyme sind vor allem am Abbau von wasserlöslichen Biopolymeren (Nukleinsäuren, Polysaccharide etc.), wasserunlösliche Verbindungen (Zellulose) und organischen Partikeln beteiligt. Der Abbau von den EPS-Matrixbestandteilen zu niedermolekularen Produkten, stellt ein externes Verdauungssystem dar (11). Ein ökonomischer Nutzen der Enzyme hat sich ergeben, indem sie industriell produziert und bei der Verarbeitung von Textilien, Wäsche etc. eingesetzt werden. Trinkwasser wird mit Hilfe von Enzymen biologisch aufbereitet und Abwasser wird durch den Abbau von organischen Substanzen von Biofilmen gereinigt (5). Eine weitere beeindruckende Eigenschaft ist, dass bei Umweltveränderungen oder Nährstoffmangel eine Dispersion durch sezernierte Enzyme von den Bakterien induziert wird. Strukturproteine sind nicht-enzymatische Proteine und lassen sich nochmals in Zelloberflächen-assoziierte Strukturproteine und kohlenhydratbindende Proteine (Lektine) einteilen. Lektine sind an der Stabilisierung der Matrix beteiligt und fungieren als Bindeglied zwischen Bakterien und EPS-Bestandteilen. Die

Oberflächenproteine an der Bakterienzelle fördern die Bildung eines Biofilms. Weitere Proteine sind Amyloide, Pili, Flagellen und Fimbrien (11).

1.2.2.3. Extrazelluläre DNA (eDNA)

Die eDNA ist ein wichtiger Bestandteil der Matrix und stellt nicht nur den Rest von lysierten Zellen dar, wie anfangs angenommen. *Bacillus cereus* verwendet eDNA z.B. zur Adhäsion an Oberflächen. Bei *Pseudomonas aeruginosa* dient die eDNA als interzelluläre Verbindungsmöglichkeit. Außerdem kann eDNA auch eine Zellyse verursachen (11). Es scheint auch, dass Bakterien eDNA-Filamente aktiv als mikrobielle Nanodrähte nutzen und sich entlang dieser bewegen können (19). Sie kann je nach Bakterienart in unterschiedlichen Strukturen vorkommen, entweder gitterartig, fadenförmig oder als dichte Struktur bestehend aus feinen Strängen. Des Weiteren scheint der Ursprung ebenso je nach Bakterienspezies unterschiedlich zu sein. Zum Beispiel gibt es bei *Gammaproteobacteria* neben Ähnlichkeiten auch Unterschiede zwischen der eDNA und der genomischen DNA. Somit kann eine aktive Ausscheidung von eDNA nicht ausgeschlossen werden (11).

1.2.3. Eigenschaften und Funktionen der Matrix

Zu Beginn jeder Besiedelung ist die Adhäsion der Zellen an Oberflächen der erste Schritt, der durch die EPS ermöglicht wird. Die räumliche Nähe der Mikroorganismen, welche durch die Matrix entsteht, erlaubt intensive Interaktionen, wie Kooperation, Kommunikation und Austausch (synergetische und Zell-Zell Kommunikation) (10). Extrazelluläre Enzyme und Nukleinsäuren können in der Matrix in Membranvesikeln, als sogenannte „Pakete“, vorkommen und fungieren zum Beispiel als externer Verdauungstrakt und Träger von genetischem Material. Diese Membranvesikel können auch Teil der biologischen Kriegsführung sein und lytische Enzyme enthalten (19). Zudem sind extrazelluläre Enzyme in der Lage Partikelmaterial und Polymere effektiv abzubauen und als Nahrungs- und Energiequelle zu nutzen (10). Außerdem stellt die Matrix ein Recyclingzentrum dar. Lysierte Zellen werden aufbewahrt und damit auch die DNA dieser Zellen, welche als Genpool dient und für den horizontalen Gentransfer verwendet wird (10,19). Der horizontale Gentransfer ist entscheidend bei der Entstehung antimikrobieller Resistenzen und übergibt den Zellen eine genetische Tasche voll mit Überlebenseigenschaften. Durch die Sorptionseigenschaften der Matrix ist die Anreicherung von organischen Verbindungen und anorganischen Ionen

möglich. Damit liefert sie den Biofilm-assoziierten Bakterien Nährstoffe aus der Umwelt und trägt zum Beispiel durch die Anreicherung giftiger Metallionen einen Beitrag zur Umweltentgiftung bei (10). Die Matrix gestaltet sich als schützende Umgebung der Biofilm-assoziierten Mikroorganismen, indem sie gegen Austrocknung, Biozide, toxische Metalle, UV-Strahlung, einige Antibiotika und vor vielen Protozoen schützt (10,22).

1.3. Problematik von Biofilmen in der Lebensmittelindustrie

Das Auftreten von Biofilmen in lebensmittelverarbeitenden Betrieben wurde in den letzten 30 Jahren zu einem der zentralen Probleme in der Umweltmikrobiologie (23), zumal die Lebensmittelindustrie zahlreiche Orte beherbergt, welche geeignete Umgebungen für die Bildung von Biofilmen abbilden (24). Gefährdet sind vor allem Milchverarbeitungsbetriebe, Brauereien, Geflügelverarbeitungsbetriebe, Verarbeitungsbetriebe von rotem Fleisch und Frischprodukte (25). Lebensmittel wie Milch und Fleisch sind angereichert mit Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten, welche sehr gute Nährstoffversorgungsquellen darstellen, und somit das Wachstum von Mikroorganismen erleichtern (26). Die Bildung eines Biofilms dient den Mikroorganismen dazu, die unterschiedlichen Umweltbedingungen in Lebensmittelbetrieben leichter zu bewältigen. Feuchtigkeits- und Temperaturwechsel, Nährstoffmangel und unterschiedliche Desinfektionsverfahren sind nur einige Beispiele für Stressoren, die in Lebensmittelverarbeitungsbetrieben vorkommen (10). Die Bildung von Biofilmen an Oberflächen in der Lebensmittelindustrie hat weitreichende Konsequenzen für Produzenten und Konsumenten. Biofilme sind potenzielle Kontaminationsquellen für Rohstoffe und verarbeitete Lebensmittel und stellen somit eine Gefahr auf vielen Stufen entlang der Lebensmittelkette dar. Die Anwesenheit von Biofilmen kann zum Verderb von Lebensmitteln und somit zur Verkürzung der Haltbarkeit führen. Daraus entstehen wirtschaftliche Verluste und im schlimmsten Fall sogar lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche (15). Viele bekannte Verderbnis- und Krankheitserreger, wie z.B. *Listeria monocytogenes* oder Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind in der Lage, Biofilme zu bilden (25,27). Sie gelangen durch direkten Kontakt über Lebensmittelkontaktflächen oder durch indirekten Kontakt, wenn sich Teile vom Biofilm ablösen und während der Produktion oder Reinigung und Desinfektion von Oberflächen ohne Lebensmittelkontakt (Wände, Böden, Gummidichtungen) auf Lebensmittelkontaktflächen gelangen, auf die Lebensmittel. Eine weitere Möglichkeit der

Kontamination stellt die bei der Reinigung entstehende Aerosolbildung dar, wodurch sich Biofilme verlagern können (15). Bei den positiven Gesichtspunkten der Biofilmbildung in der Lebensmittelindustrie stehen vor allem biotechnologische Anwendungen im Vordergrund. Beispielsweise spielen Biofilme bei der Herstellung von fermentierten Produkten eine Rolle (z.B. Essig). Weiters konnten Studien zeigen, dass bei der Produktion von Ethanol durch *Saccharomyces cerevisiae*-Biofilme ein Vorteil gegenüber konventioneller Fermentation, aufgrund der höheren Produktivität, bestand (5). Trotz der positiven Aspekte sind Biofilme als strukturierte mikrobielle Gemeinschaften resistenter gegenüber antimikrobiellen Desinfektionsmitteln und Umweltstressoren (10,22). Sobald sie sich gebildet haben, sind Biofilme schwer zu entfernen und die daraus entstehenden Risiken und Kosten sehr hoch. Aus diesem Grund ist es maßgeblich, unerwünschte Biofilme vorzubeugen, zu kontrollieren und zu beseitigen (26).

1.3.1. Relevante Biofilm-bildende Bakterien in der Lebensmittelindustrie

Zu den möglichen Eintragungswegen von Biofilmen zählen die Oberflächen der Betriebseinrichtungen (Geräte-, Transport-, Lager- und Bodenflächen), biologische Oberflächen (Gemüse, Fleisch, etc.) sowie Wasser, Angestellte und Tiere (10,25,28). Außerdem können Biofilme Toxine in die Umgebung absondern und so Lebensmittel kontaminieren (28). Beispiele für relevante Biofilm-assoziierte Verderbnis- und Krankheitserreger, sind *Bacillus (B.) cereus*, *Cambylobacter jejuni*, *Pseudomonas* spp., EHEC, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* und *Staphylococcus aureus* (26). *B. cereus* ist beispielsweise in der Lage Endosporen zu bilden, welche den Pasteurisierungsschritt überleben können und daher ein großes Risiko darstellen. Außerdem besitzen *Bacillus cereus*-Biofilme einen Vorkonditionierungseffekt und begünstigen die Anheftung anderer Bakterienarten mit weniger ausgeprägtem Biofilmbindungspotential, die andernfalls z.B. durch Strömungen entfernt werden würden. *Bacillus cereus*-Biofilme sind häufig an Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen zu finden und manche Stämme sogar an untergetauchten Flächen, wie Edelstahltanks und Rohren (28). Sie können eine Vielzahl von Tensiden, Enzymen und Bacteriocinen absondern und dadurch die Qualität von Lebensmitteln beeinträchtigen (26). Der *Escherichia coli* Serotyp O157:H7 (EHEC) wird am häufigsten mit Infektionen bei Menschen assoziiert. Bei der Bildung eines EHEC-Biofilms, spielt die Hydrophobie der Oberfläche eine wichtige Rolle. Der Serotyp wurde z.B. öfter an Edelstahloberflächen als an hydrophoben Polypropylen-Oberflächen gefunden. Weiters

besitzt ein EHEC-Biofilm höhere Beständigkeit gegen hohe Temperaturen, hohen Druck und gängig benutzte Desinfektionsmittel im Vergleich zu anderen *E. coli* Serotypen, wie beispielsweise O111:H- und O145 (26,28). Dies könnte teilweise auf Unterschiede im Status des *rpoS*-Gens zurückzuführen sein. Das *rpoS*-Gen kodiert den alternativen Sigma-Faktor RpoS (RNA Polymerase Sigma-Faktor), welcher an der generellen Stressantwort von *E. coli* in der stationären Phase beteiligt ist (29). *Listeria monocytogenes*-Biofilme sind häufig auf Polypropylen, Stahl, Gummi und Glasoberflächen zu finden. Durch seine Replikationsfähigkeit bei niedrigen Temperaturen, induziert das Bakterium als Antwort auf kalte Temperaturen die Biofilmbildung, um die Anheftung an Oberflächen und die Resistenz gegen Reinigungs- und Desinfektionsverfahren zu erhöhen (28). Das Bakterium kann unter Laborbedingungen Reinkultur-Biofilme bilden aber auch in Multispezies-Biofilmen vorkommen (26). *Pseudomonas* spp. nehmen eine besonders wichtige Rolle ein, da diese psychrotrophen Bakterien auch unter 10 °C Biofilme bilden können. Außerdem sind sie in der Lage viele EPS zu produzieren und können an Edelstahl anheften. Sie können zusammen mit pathogenen Mikroorganismen, wie Salmonellen und Listerien, in einem Biofilm vorkommen, wie z.B. in Lagertanks von Molkereien. Darüber hinaus sind sie in der Lage, Enzyme (Lipasen, Proteasen) zu produzieren, welche hitzestabil sind und in die Milch abgegeben werden können (30). Die Vereinigung von mehreren Spezies in Biofilmen (Multispezies-Biofilme) bietet Vorteile, wie oben beschrieben (10). Mehrere Studien haben berichtet, dass die Biofilmproduktion von *Salmonella* spp. durch die Anwesenheit von anderen Bakterien gefördert wird. Die Lebensgemeinschaften können jedoch nicht nur kooperativ und neutral, sondern auch kompetitiv sein. Ein Beispiel dafür wäre die Produktion von organischen Säuren oder Enzymen einer Bakterienart bei Nährstoffmangel, die die Adhäsion und/oder Vermehrung anderer Bakterien einschränkt bzw. inhibiert (31).

1.4. Problematik von Biofilmen in der Milchindustrie

Milch und Milchprodukte nehmen in der Ernährung der Menschen einen wichtigen Platz ein (32). Im Jahr 2021 konnte von 2.800 österreichischen Haushalten der Pro-Kopf-Verbrauch von Trinkmilcherzeugnisse auf 70 kg, von Obers und Rahm auf 7,5 kg, von Butter auf 5,4 kg und von Käse auf 23,2 kg aufgezeichnet werden (33). Milch und Milchprodukte werden täglich konsumiert, da sie unter anderem ausreichend Eiweiß, Fett, essenzielle Aminosäuren und Mineralien wie Kalzium und Phosphor enthalten. Daher ist die Bereitstellung von qualitativ hochwertigen Produkten von öffentlichem und wirtschaftlichem Interesse, um

lebensmittelbedingte Krankheiten verhindern zu können. Aufgrund der Nährstoffe und des neutralen pH-Wertes der Milch von 6,8, stellt sie die passende Umgebung vieler pathogener Mikroorganismen dar (32). Die Entstehung von Biofilmen lässt sich einerseits auf unzureichend gereinigtes Equipment (Melkusrüstung) auf Milchviehbetrieben und somit kontaminierte Rohmilch zurückführen (25). Weitere Faktoren, wie die Anzahl der Tiere, Tierhaltungssysteme, Melkmanagement und die Jahreszeit, beeinflussen die Kontamination (34). Andererseits kann es im Zuge der Milchverarbeitung durch mangelnde Hygiene und zu großen Zeitintervallen zwischen Produktion und den Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zur Biofilmbildung kommen (25). Überdies können zurückgebliebene Lebensmittelrückstände, wie z.B. Proteine aus der Milch, welche einen konditionierenden Film an Lebensmittelverarbeitungsgeräten bilden können, die Adhäsion von Bakterien fördern (5). Die verstärkte Produktion von Enzymen (Lipasen, Proteasen) durch Biofilm-assoziierten Bakterien ist problematisch für die Qualität der Rohmilch, pasteurisierter und Ultra-Hoch-Temperatur-Milch, da sie häufig hitzeresistent sind (25,35). Der Abbau von Proteinen und Lipiden in der Milch durch die Enzyme kann zu einem bitteren oder ranzigen Fehl aroma führen (35,36). Neben den erwähnten Endosporen von *B. cereus*, welche die Pasteurisierung überleben können, konnten in Rohrleitungen nach der Pasteurisierung Gram-negative Bakterien detektiert werden, die eigentlich nicht dazu in der Lage sein sollten, den Erhitzungsprozess zu überleben (37). Das Auffinden von normalerweise hitzeempfindlichen Organismen ist unter anderem auf die Bildung von Multispezies-Biofilmen und auf die schützende Matrix zurückzuführen (38). Zu den Bakterien, welche in Biofilmen vorkommen und häufig in Molkereiumgebungen anzutreffen sind, gehören Bakterien der Gattung *Enterobacter*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* und *Pseudomonas* (22). Aufgrund all dieser Gegebenheiten ist es von entscheidender Bedeutung, Hygienemaßnahmen und Standardprotokolle entlang des gesamten Produktionsprozesses einzuhalten, um die Sicherheit der Lebensmittelversorgung und den Schutz der öffentlichen Gesundheit garantieren zu können (39).

1.5. Reinigung und Desinfektion von Biofilmen

Biofilm-assoziierte Bakterien haben eine 10 bis 1000-fach höhere Persistenz und Resistenz gegenüber Desinfektionsmittel und Antibiotika als Bakterien in ihrer planktonischen Form. Hauptgründe hierfür sind strukturelle Biofilmbarrieren und der rege Austausch von Genen, die die Resistenzentwicklung fördern (10,40), wobei Gram-positive Bakterien im Allgemeinen

resistenter sind als Gram-negative Bakterien (26). Es gibt mittlerweile unterschiedliche Ansätze zur Bekämpfung von Biofilmen (26). Die Auswahl von Materialien, welche leicht für die mechanische Reinigung zugänglich sind, mit handelsüblichen Mitteln gereinigt und desinfiziert werden können und bei Verschleiß erneuert oder ausgetauscht werden, stellt jedoch eine Grundvoraussetzung dar (15,16). Je nach Bakteriengattung und Bakterienart scheint die bakterielle Adhäsion und die Rolle der Oberflächeneigenschaften unterschiedlich zu sein. Einige Laborstudien zeigen, dass *Staphylococcus aureus*-Stämme stärker an hydrophoben als an hydrophilen Oberflächen haften, *Pseudomonas aeruginosa* verhält sich gegenteilig. Andere Studien haben jedoch wieder gezeigt, dass die Adhäsion von *Staphylococcus aureus*-Stämmen auf hydrophoben als auch auf hydrophilen Oberflächen ähnlich war (41). Die Beteiligung der Oberflächenrauheit bei der Adhäsion von Bakterien wird kontrovers diskutiert und erfordert noch weitere Studien. Tatsächlich erschwert jedoch die Oberflächenrauheit den Reinigungsprozess, da die Effizienz von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln in Rissen und Spalten herabgesetzt ist und die Risse und Spalten den Bakterien einen schützenden Bereich bieten (15,41). Das am häufigsten angewandte Verfahren zur Kontrolle von Biofilmen ist die Kombination von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln (26). Organisches und anorganisches Material wird durch alkalische und saure Reinigungsmittel eliminiert, während ein Desinfektionsmittel vorhandene Mikroorganismen reduziert und auf ein sicheres Niveau verringert bzw. eliminiert (25). Die Reinigung ist dafür da, die EPS-Matrix aufzulösen damit Desinfektionsmittel den Zugang zu den Zellen erhalten und um alle Lebensmittelreste und andere Verbindungen, die die Biofilmbildung fördern und das Wirken der Desinfektionsmittel verringern, effektiv zu entfernen (15,25). Um den Kraftaufwand bei der Reinigung zu reduzieren, sollte auf höhere Wassertemperaturen und mechanische Unterstützung, wie z.B. Bürsten und Schrubben, geachtet werden (22,25). Das Cleaning in Place-Verfahren (CIP-Verfahren) wird häufig in der Lebensmittelindustrie für die Reinigung und Desinfektion von kompletten Systemen, ohne dabei eine wesentliche Demontage der Maschinen durchzuführen, angewendet (22). Bei Desinfektionsmitteln sind mehrere Faktoren, wie z.B. pH-Wert, Wasserhärte, Temperatur, Einwirkzeit und Konzentration des Desinfektionsmittels zu beachten und einzuhalten, um Bakterien effektiv zu töten und eine erneute Biofilmbildung zu verhindern (16,22).

1.5.1. Desinfektionsmittel

In der Lebensmittelindustrie werden unter anderem am häufigsten Hypochlorit, quartäre Ammoniumverbindungen (QAV) und Peressigsäure verwendet (16,26). Natriumhypochlorit ist eines der am weitverbreitetsten Desinfektionsmittel aufgrund seiner stark oxidierenden Wirkung und der Fähigkeit die Zellmembran zu durchstoßen. Es hat jedoch den Nachteil, dass es durch die hohe Reaktionsfreudigkeit durch organische Stoffe beeinträchtigt werden kann (26). Peressigsäure ist im Gegenzug auch ein wirksames, starkes Oxidationsmittel und interagiert nicht mit organischen Stoffen. Es besteht aus Essigsäure und Wasserstoffperoxid und wird vor allem in der Lebensmittelindustrie für die Wasser- und Abwasserbehandlung verwendet. Seine Umweltverträglichkeit und Wirksamkeit macht Peressigsäure zu einem attraktiven Desinfektionsmittel (22). Quartäre Ammoniumverbindungen, wie z.B. Benzalkoniumchlorid, sind kationische Tenside, welche die Oberflächenspannung verringern und Mizellen bilden können. Sie können beispielsweise mit der Zytoplasmamembran von Bakterien als auch mit der Plasmamembran von Hefen interagieren. Die Verwendung und Wirksamkeit wird jedoch aufgrund der relativ hohen Resistenzen gegen Listerien, Staphylokokken und Pseudomonaden in Frage gestellt (26).

1.5.2. Alternative Methoden

Zu den alternativen Methoden der Biofilmbekämpfung gehören z.B. Bakteriophagen, QS-Inhibitoren, Ultraschall, Enzyme und Oberflächen, welche mit antimikrobiellen Zusätzen benetzt sind, um die anfängliche Adhäsion von Bakterien zu minimieren (22,26). Bakteriophagen sind spezifische Viren, die ihre DNA in bakterielle Organismen injizieren und die Zelle dazu zwingen einen neuen Bakteriophagen zu produzieren. Die befallenen Zellen werden nach Fertigstellung des neuen Bakteriophagen lysiert (26). Eine weitere Möglichkeit stellen QS-Inhibitoren dar, da QS unter anderem die EPS-Expression, den organischen Schadstoffabbau und die Konstruktion des Biofilms reguliert (26). Beispiele für QS-Inhibitoren sind Salicylsäure und Meerrettich-Extrakte (40). Die Anwendung von Ultraschall wird mit anderen Techniken kombiniert und erweist sich als vielversprechende Alternative. Beispielsweise zeigte die Kombination von Ultraschall und Enzyme eine hohe Wirksamkeit bei der Eliminierung von Biofilmen. Ultraschall soll weiters die Wirksamkeit von Antibiotika gegen Biofilme erhöhen durch Verbesserung der Diffusion von Sauerstoff in den Biofilm und durch einen schnelleren Transport von Antibiotika in den Biofilm-Komplex, bevor sie dagegen Resistenzen entwickeln können (22). Enzyme (DNasen, Proteasen, Amylasen) kommen zum Einsatz, um die EPS-Komponenten zu zersetzen und so die Zellen freizulegen

(40). Da die Matrix einen heterogenen Komplex darstellt, ist die Kombination von Enzymen erforderlich (25). Außerdem weisen Enzyme eine geringe Toxizität auf und sind biologisch abbaubar (26). Insgesamt lässt sich sagen, dass die Kombination aus zwei oder mehreren Kontrollstrategien, auch als Hürdentechnologie bekannt, ein zielführender Ansatz zur Bekämpfung von Biofilmen in der Lebensmittelindustrie darstellt. Allerdings werden in der Lebensmittelindustrie bisher noch konventionelle Bekämpfungsstrategien (Desinfektionsmittel) den alternativen Bekämpfungsstrategien vorgezogen. Der Einsatz von umweltfreundlichere und wirtschaftlichere Methoden ist jedoch unabdingbar, um die Anforderungen der industriellen Lebensmittelsicherheit erfüllen zu können (22).

1.6. Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von verschiedenen Oberflächen nach der Reinigung und Desinfektion auf das Vorhandensein von Biofilmen in einer österreichischen Molkerei. Von derselben Molkerei wurden bereits zwei Jahre zuvor im Oktober 2020 Proben genommen und auf Biofilme untersucht. Aufgrund der Identifizierung von Biofilm-positiven Stellen, hat die Molkerei Einzelmaßnahmen an diesen Stellen ergriffen. Mit der vorliegenden Arbeit soll festgestellt werden, ob diese Einzelmaßnahmen effektiv genug waren und ob neue bzw. bestehende Schwachstellen identifiziert werden können. Mittels Zellschaber und Tupferabstrichen wurden von ausgewählten Stellen der Molkerei-Anlagen sowohl produktberührende als auch nicht-produktberührende Oberflächen beprobt und untersucht. Die Proben wurden auf das Vorhandensein von Bakterien (quantitative Analyse mithilfe von molekularbiologischen Verfahren) und der drei Hauptbestandteile der EPS-Matrix Kohlenhydrate, Proteine und eDNA (chemische Analyse) untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie sollten einerseits der Molkerei helfen, ihren Reinigungs- und Desinfektionsprozess zu überprüfen und andererseits einen Weg für ein besseres Verständnis von Biofilmen ebnen.

2. Material und Methodik

2.1. Probenprozessierung

2.1.1. Probennahme

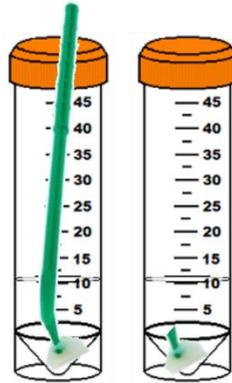
Die Probennahme, Probenvorbereitung und Analyse basierten auf bereits publizierten Methoden (42). Beprobte wurde eine österreichische Molkerei, in welcher bereits in einem vorangegangenen Projekt im Oktober 2020 Biofilmanalysen durchgeführt wurden, wobei davon in der vorliegenden Arbeit neun Stellen erneut beprobt wurden (Tab. 1). Diese Molkerei bietet ein umfangreiches Sortiment an, welches sowohl eine weiße (Milch und Milchprodukte) als auch eine gelbe Linie (Käseprodukte) beinhaltet. Zur Probennahme wurde eine Anleitung und folgende Utensilien gekühlt (4 °C) per Post an die Molkerei gesendet: 21 Zellschaber (Zellschaber, 245 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland), 70 Tupfer (FLOQSwabs®, Copan Italia S.p.A., Italien) und 21 × 50 ml Falcon-Röhrchen (CELLSTAR® TUBES, Greiner Bio-One GmbH, Österreich) mit je 10 ml 0,25-fache Ringer-Lösung (Ringer B. Braun, Ecotainer®, B. Braun SE, Deutschland) darin. Die Anleitung beinhaltete Informationen zu der Art und Weise der Probennahme und eine bildnerische Darstellung des Probennahmen-Vorgangs (Abb. 2). Von großer Bedeutung war desinfizierte Handschuhe bei der Probennahme zu tragen und darauf zu achten, den Zellschaber und den Tupfer steril zu entnehmen. Bei sehr trockenen Oberflächen wurde empfohlen, den Zellschaber und den Tupfer vorher in die Ringerlösung zu tauchen, damit das Abtragen von potenziellen Biofilmen effektiver ist. Jede zu untersuchende Stelle sollte unter Druck mit einem Zellschaber und zwei Tupfer beprobt werden. Nach der Beprobung wurden der Zellschaber und die zwei Tupfer in das Röhrchen mit der Ringerlösung getaucht und an den jeweiligen Sollbruchstellen abgebrochen. Insgesamt wurden 20 unterschiedliche Probennahmestellen (Tab. 1) beprobt, wovon 15 Stellen produktberührend waren. Die produktberührenden Stellen wurden im gereinigten Zustand beprobt. Es wurden bewusst jene Probennahmestellen gewählt, welche bekannt für Biofilmbildung sind. Pro Stelle wurden ca. 400 cm² Probennahmefläche bearbeitet. Ebenso wurden zwei Negativkontrollen (NK) entnommen, welche die Prozedur der Tupfer und Zellschaber-Verwendung widerspiegelte. Eine NK in der Molkerei und eine NK später intern im Labor. Die Proben wurden per Expressversand gekühlt (4 °C) an die Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, gesandt.

Tab. 1: Probennahmestellen entlang der Käseproduktion, an denen Biofilmproben genommen wurden. Grüne Felder stehen für produktberührende Stellen, rote Felder für nicht-produktberührende Stellen und gelbe Felder kennzeichnen diejenigen Entnahmestellen, welche bereits im Jahr 2020 in einem vorangegangenen Projekt von Lourenco et al. (2023) untersucht und nun in dieser Arbeit erneut beprobt wurden.

Proben	Entnahmestelle	Anmerkung	Produkt-berührend	Im Projekt 2020 beprobt
1	Fertiger 1	Innen	Ja	Ja
2	Fertiger 1	Messer	Ja	Ja
3	Fertiger 1	Außenkante Öffnung	Nein	Ja
4	Fertiger 4	Innen	Ja	Ja
5	Fertiger 4	Messer	Ja	Ja
6	Fertiger 4	Molkekorb außen	Ja	Nein
7	Vorpresswanne (Presse 8)	Abfüller innen	Ja	Nein
8	Vorpresswanne (Presse 8)	Innen blaues Band	Ja	Nein
9	Vorpresswanne (Presse 8)	Pressdeckel	Ja	Nein
10	Bruchleitung	Innen bei Käsepresse 6 und 7	Ja	Ja
11	Waschmaschine	Zone A	Nein	Ja
12	Waschmaschine	Zone B	Nein	Nein
13	Waschmaschine	Zone C	Nein	Nein
14	Klimagerät	Reifungsraum 2	Nein	Ja
15	Presse 7	Wanne innen	Ja	Nein
16	Presse 7	Pressdeckel	Ja	Nein
17	Käseformen	Über Nacht in Formenlager	Ja	Ja
18	Verweiler 10	Abtropfasse	Ja	Nein
19	Käseform	Direkt nach Waschmaschine	Ja	Nein
20	Presse 7	Käse Kassette	Ja	Nein
21	Negativkontrolle Betrieb	Betrieb: Zellschaber und Tupfer	Nein	Nein
22	Negativkontrolle Labor	Intern (Labor): Zellschaber und Tupfer	Nein	Nein



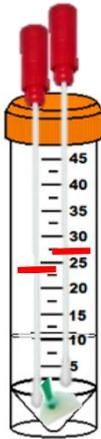
1. Ca. 400 cm² mit Zellschaber bearbeiten.



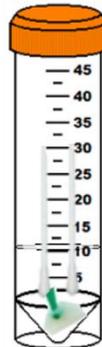
2. 10 ml 0,25x Ringer. Zellschaber rein, Kopf abtrennen.



3. Mit mind. 2 Tupfer unter Druck beproben.



4. Alle Tupfer in Röhrchen (Sollbruchstelle)



5. Negativkontrolle, Proben und Probeninfos gekühlt senden

Abb. 2: Anleitung zur Probennahme von Biofilmpflanzen von den in der Tab. 1 genannten Probennahmestellen. Es wurde auf eine hygienische Beprobung geachtet und von jeder Stelle ca. 400 cm² unter Druck mit einem Zellschaber und zwei Tupfer beprobt. Der Zellschaber und die beiden Tupfer wurden an der Sollbruchstelle abgetrennt und im Anschluss in ein 50 ml Röhrchen, gefüllt mit 10 ml 0,25-fache Ringer-Lösung, gegeben und gekühlt für die Weiterverarbeitung in das Labor gesandt.

2.1.2. Probenvorbereitung

Nach 24 Stunden erfolgte die Weiterverarbeitung der Proben im Labor. Der erste Schritt war die Zugabe von 2 g Ionenaustauschharz (CER, Amberlite® HPR110, 20–50 Maschenweite, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) zu allen 22 Proben. Danach wurden die Proben

für 20 Minuten bei 500 Umdrehungen pro Minute (rpm) geschüttelt (Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland). Als nächstes wurden die Proben für 20 Minuten bei $3.180 \times g$ (3.900 rpm, Radius 18,7 cm) zentrifugiert (Eppendorf® Centrifuge 5810/5810 R, Eppendorf Austria GmbH, Österreich). Der Überstand wurde mit Hilfe einer serologischen 10 ml Pipette (CELLSTAR® Serologische Pipetten, Greiner Bio-One GmbH, Österreich) aufgenommen und durch einen $0,22 \mu\text{m}$ Filter (Filtropur S, Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland) in ein 15 ml Röhrchen (CELLSTAR® TUBES, Greiner Bio-One GmbH, Österreich) überführt. Der überführte Überstand wurde bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Matrix-Analyse eingefroren. Das übrige Pellet, in welchem sich die Bakterien- und das Ionenaustauschharz befanden, wurden ebenso bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Prozessierung eingefroren.

2.2. Nachweis von bakterieller DNA

2.2.1. Prozessierung des Pellets und DNA-Extraktion

Die Bakterien- und Ionenaustauschharz enthaltenden Pellets wurden vor der DNA-Extraktion gewaschen, um die Bakterien von dem Ionenaustauschharz zu trennen. Dafür wurde zu jeder Probe zweimal jeweils 5 ml einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS; $1 \times$ Phosphat Buffered Saline, pH 7,6, Jena Bioscience GmbH, Deutschland) hinzugefügt, fünf Sekunden gevortext (Scientific Industries SI™ Vortex-Genie™ 2, Scientific Industries Inc., Vereinigte Staaten), eine Minute sedimentieren lassen und danach der Überstand und somit die darin enthaltenen Bakterien in ein neues Eppendorfer-Röhrchen (Eppendorf Safe-Lock® Tubes, Eppendorf Austria GmbH, Österreich) pipettiert. Dieser Überstand wurde erneut gevortext, 5 ml in ein weiteres 15 ml Röhrchen übertragen, bei $3.180 \times g$ (3.900 rpm, Radius 18,7 cm) fünf Minuten zentrifugiert und auf ein 2 ml Pellet dekantiert. Dieses Pellet wurde für die DNA-Extraktion verwendet. Die übrigen 5 ml Überstand wurden als Rückstellprobe bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels DNA-Extraktionskit (DNeasy®PowerLyzer®Microbial-Kit, QIAGEN GmbH, Deutschland) unter Anwendung des QIAvac 24 Plus Vacuum Manifold Protokolls nach Herstellerangaben. Es wurde eine weitere Negativkontrolle nur mit den Reagenzien des Kit mitlaufen lassen (NK-Kit). Die mit $50 \mu\text{l}$ Solution EB eluierte DNA wurde bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.2.2. Quantitative PCR

Um die bakterielle DNA zu quantifizieren, wurde eine qPCR basierend auf dem 16S Gen durchgeführt („Gesamtbakterien-Primer“). Der Mastermix für jede Reaktion (20 µl) beinhaltete: 5 µl sterilfiltriertes Wasser (Water for molecular biology, sterile filtered, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland), 1,25 µl (Finale Konzentration im Mastermix: 250 nM) F341 (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') als Vorwärtsprimer, 1,25 µl (Finale Konzentration im Mastermix: 250 nM) R534 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') als Rückwärtsprimer und 12,5 µl Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix (Agilent Technologies Österreich GmbH, Österreich). Um auf 25 µl Gesamtreaktionsvolumen zu kommen, wurden je 5 µl der 22 Proben, 5 µl NK-PCR (sterilfiltriertes Wasser), oder 5 µl der Standards (DNA von bekannter Konzentration in fünf 10-er Verdünnungsstufen von $4,78 \times 10^7$ – $4,78 \times 10^3$ bacterial cell equivalents (bce)) zugefügt. Jede Reaktion wurde im Duplikat durchgeführt. Der erste Erhitzungsschritt erfolgte bei 95 °C für drei Minuten, gefolgt von 40 Zyklen von 95 °C fünf Sekunden, 60 °C 20 Sekunden. Der letzte Denaturierungsschritt für die Dissoziationskurve war 95 °C für eine Minute, 60 °C für 30 Sekunden und 95 °C für 30 Sekunden. Die qPCR wurde mit dem Gerät Stratagene® Mx3000P™ (Agilent Technologies Österreich GmbH, Österreich) durchgeführt. Für die Auswertung der qPCR wurde eine absolute Quantifizierung verwendet. Dafür wurde anhand der Standardkurve (92,8 % Effizienz) die bakterielle Kopienanzahl (bce) für die Proben berechnet. Von den Mittelwerten der Proben 1–22 und NK-Kit wurden die bce der NK-PCR abgezogen. Danach wurde auf 50 µl Eluierungsvolumen hochgerechnet, die angepasste Konzentration von NK-Kit, NK-Labor und NK-Betrieb nacheinander von den Proben 1–20 abgezogen. Alle Proben mit einer bce > 1 wurden als positiv gewertet und als bce/cm² berechnet.

2.3. Matrix-Analyse

Für die Matrix-Analyse wurde die Matrixprobe der einzelnen Proben wie folgt aufgeteilt: zweimal 1.000 µl für die Kohlenhydrat- (in 1,5 ml Eppendorfer-Röhrchen), 1000 µl für die Protein- (in 2 ml Eppendorfer-Röhrchen) und 500 µl für die eDNA-Bestimmung (in 2 ml Eppendorfer-Röhrchen). Die gesamte Kohlenhydrat-Analyse erfolgte im Duplikat.

2.3.1. Kohlenhydrat-Analyse

2.3.1.1. Evaporation

Um die Kohlenhydrat-Konzentration in den Proben zu erhöhen, erfolgte am Anfang ein Verdunstungsschritt. Dafür wurden für die 22 Proben-Röhrchen noch zusätzlich zwei 1,5 ml Eppendorfer-Röhrchen für die Negativ- und Positivkontrolle vorbereitet. Alle 24 × 1,5 ml Eppendorfer-Röhrchen wurden vor Zugabe der Proben abgewogen (Feinwaage Cubis® II Premium Laborwaage, Sartorius Austria GmbH, Österreich). Dann wurden die 22 Matrixproben (1 ml), die Negativkontrolle (1 ml sterilfiltriertes Wasser) und die Positivkontrolle (1 ml Glukose, 1.600 ng/50 µl) zugefügt und danach die gefüllten Röhrchen erneut gewogen. Im Anschluss wurden alle Proben geöffnet und für eine Stunde auf einem vorgeheizten Thermoblock (Eppendorf ThermoMixer compact®, Eppendorf Austria GmbH, Österreich) bei 95 °C und bei 300 rpm inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte eine erneute Abwaage der Proben. Anschließend erfolgte die gleiche Prozedur mit den Duplikaten. Der Gewichtsverlust der Evaporation wurde als Differenz in Excel berechnet.

2.3.1.2. Quantifizierung

Für die Quantifizierung der Kohlenhydrate wurden ein Phenol-Schwefelsäure-Test durchgeführt. Um die Konzentration der einzelnen Proben berechnen zu können, wurden acht Standards für den Phenol-Schwefelsäure-Test vorbereitet. Die Standardkurve enthielt folgende Konzentrationen: 5.231, 4.185, 3.139, 2.093, 1.046, 523, 262, 0 ng/50 µl Glukose. Für den Test wurde eine 96-Well-Platte (Zellkulturplatte, 96 Well, Oberfläche: Standard, Flachboden, Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland) verwendet. Jeweils 50 µl der 24 evaporierten Proben und der acht Standards wurden im Triplikat in die Platte pipettiert. Anschließend wurden 150 µl konzentrierte Schwefelsäure und 30 µl einer 5 % Phenol-Wasser-Lösung hinzugegeben. Um alle drei Komponenten sorgfältig mittels Auf- und Abpipettierens miteinander zu vermengen, wurde eine 8-Kanal-Pipette (Eppendorf Research® plus, 8-Kanal-Pipette, Eppendorf Austria GmbH, Österreich) benutzt. Die Zugabe der Schwefelsäure und der 5 % Phenol-Wasser-Lösung geschah unter einem Abzug. Im Anschluss wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt und in einem Wasserbad (Wasserbad WBT12, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) bei einer Temperatur von 95 °C für fünf Minuten inkubiert. Nach fünf Minuten wurde die Platte aus dem Wasserbad vorsichtig herausgegeben und für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Folie entfernt und die Kohlenhydratmessung durchgeführt. Mit einem Mikrotiterplatten-

Lesegerät (Infinite® F200, Tecan Austria GmbH, Österreich) wurde die Absorption bei 490 nm gemessen. Die Messung erfolgte für die gesamte Platte im Duplikat. Im Anschluss wurde der Phenol-Schwefelsäure-Test erneut mit den Duplikaten durchgeführt und ebenso zweimal gemessen. Mit Hilfe der Standardkurve wurde die Menge an Glukose der einzelnen Proben berechnet ($y = 0,0001 \times x + 0,0123$, $R^2 = 99,22 \%$ bzw. für die Duplikate: $y = 0,0001 \times x + 0,0191$, $R^2 = 99,58 \%$). Um die Evaporation miteinzubeziehen, wurde der Gewichtsverlust bei der Errechnung der Kohlenhydrat-Konzentration berücksichtigt. Jede Berechnung wurde pro Well durchgeführt und alle Werte wurden zuerst auf die ursprüngliche Menge von 10 ml (Ringer-Lösung) hochgerechnet. Nach der Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung (SD) pro Probe aus den zwölf Prozess- und Messduplikaten, wurde das Ergebnis pro cm^2 berechnet. Es wurden nur Proben als positiv gewertet, wenn sie in allen Messwiederholungen über dem Detektionslimit von 100 ng/50 μl lagen.

2.3.2. Extrazelluläre DNA-Analyse

2.3.2.1. Ethanol-Präzipitation

Es wurden insgesamt 24 Proben inklusive einer Negativkontrolle (500 μl 0 ng/ μl H₂O) und einer Positivkontrolle (500 μl 15 ng/ μl salmon sperm DNA) untersucht. Die eDNA wurde zu Beginn präzipitiert, um die Konzentration der extrazellulären DNA zu erhöhen. Dazu wurden zu den vorbereiteten Proben 50 μl 3 M Na-Acetat mit einem pH-Wert von 5,2, 1.250 μl eiskaltem 100 % Ethanol und 50 μl 0,1 M Magnesiumchlorid hinzugegeben. Dies geschah auf Eis unter einem Abzug. Nach einer gründlichen Vermischung mit der Pipette wurden die Proben für 24 Stunden bei -20 °C gelagert, um die DNA auszufällen. Am nächsten Tag wurden die Proben bei $19.090 \times g$ (15.292 rpm, Radius 7,3 cm), in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf® Centrifuge 5424, Eppendorf Austria GmbH, Österreich) für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig entfernt und das Pellet wurde mit 500 μl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben erneut für 15 Minuten zentrifugiert. Als nächstes wurde der Überstand grob mit einer 1.000 μl Pipette (Eppendorf Research® plus, Eppendorf Austria GmbH, Österreich) und der Rest gründlich mit einer 100 μl Pipette (Eppendorf Research® plus, Eppendorf Austria GmbH, Österreich) entfernt und das DNA-Pellet für fünf Minuten bei geöffnetem Deckel getrocknet. Zum Schluss wurde das luftgetrocknete DNA-Pellet in 30 μl sterilfiltriertes Wasser resuspendiert.

2.3.2.2. Messung der extrazellulären DNA

Die eDNA-Konzentration wurde anschließend mit dem Spektrophotometer/Fluorometer (DS-11 FX+, DeNovix Inc., Vereinigte Staaten) gemessen. Damit erfolgte ein quantitativer Nachweis von eDNA. Dafür wurde von allen 24 Proben jeweils 1 µl verwendet. Die Messung wurde pro Probe zweimal durchgeführt. Für die Berechnung der Ergebnisse wurde von allen Proben der Mittelwert und die SD berechnet. Es wurden nur Proben als positiv gewertet, wenn sie in allen Messwiederholungen über dem Detektionslimit von 2 ng/µl lagen. Mit Hilfe folgender Formel wurde das Ergebnis der Messung in die Konzentration der ursprünglichen Einsatzmenge umgerechnet: $K_1 \times V_1 = K_2 \times V_2 \rightarrow K_1 \times 500 \mu\text{l} = K_2 \times 30 \mu\text{l} \rightarrow K_1 = K_2 \times 30 \mu\text{l}/500 \mu\text{l}$

K_1 ... Konzentration in ng/µl

V_1 ... 500 µl = ursprüngliche Probemenge

K_2 ... quantitative Messung mittels Spektrometrie

V_2 ... 30 µl = Probenmenge nach der Aufkonzentration

Anschließend wurde die eDNA-Menge der positiven Proben für das Probenvolumen in 10 ml Ringerlösung und danach auf ng/cm² umgerechnet.

2.3.3. Protein-Analyse

2.3.3.1. Präzipitation

Zu den 22 Matrixproben wurden zusätzlich eine Negativkontrolle (1 ml H₂O) und eine Positivkontrolle (1 ml 0,1 g/L bovines Serumalbumin) vorbereitet. Für die Ausfällung der Proteine, um die Konzentration und somit die Nachweisgrenze zu erhöhen, wurden zu den 1 ml Proben jeweils 100 µl Trichloressigsäure (TCA)/Aceton (10 %) und 11 µl Deoxycholat (0,02 %) zugegeben. Dieser Vorgang geschah auf Eis unter einem Abzug. Alle 24 Proben wurden danach gründlich mit einer 1.000 µl Pipette vermischt und über Nacht bei 4 °C auf Eis gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Proben für 15 Minuten bei 14.000 × g (13.096 rpm, Radius 7,3 cm) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand grob mit einer 1.000 µl Pipette und der Rest gründlich mit einer 100 µl Pipette entfernt. Das verbliebene Pellet wurde anschließend für fünf Minuten luftgetrocknet. Nach fünf Minuten wurde das Pellet in 25 µl einer 0,05 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Chlorwasserstoff-Lösung

(TRIS-HCl-Lösung) aufgelöst. Zum Schluss wurden die Proben drei Stunden lang bei einer Temperatur von 4 °C auf Eis gestellt.

2.3.3.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Proteinnachweis erfolgte mittels Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) mit anschließender Silberfärbung. Mit diesem Verfahren werden Proteine nach ihrer Größe getrennt und mithilfe der Färbemethode ihr Vorhandensein sichtbar gemacht. Sollten Proteine vorhanden sein, zeichnet sich dies, durch entstehende Banden auf dem Gel ab. Es wurden zu Beginn 60 ml 15 % Trenngel hergestellt. Dafür wurden 13,8 ml destilliertes H₂O, 30 ml Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland), 15 ml 1,5 M TRIS-Puffer (TRIS PUFFERAN® ≥99,9 %, Ultra Qualität, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) mit einem pH von 8,8, 600 µl 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS, ultra pure, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland), 600 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS for molekular biology, suitable for electrophoresis, ≥98 %, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Österreich) und 48 µl Tetramethylethylenediamin (TEMED #1610800, Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H, Österreich) in ein Becherglas pipettiert. Hierfür wurden serologische 10 ml und 25 ml (Sarstedt Serologische Pipetten, Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland) Pipetten verwendet. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde das Gel sorgfältig vermischt. Danach wurde das Gel in einen Gelgießstand (Hofer™ Multi-Gelausgießer, Hofer Inc., Vereinigte Staaten) mit insgesamt vier Glasplatten pipettiert. Zwei Platten stellten ein Paar dar mit einem Abstand in der Mitte, um dort das Gel einzufüllen. Die beiden Glasplatten-Paare wurden links und rechts mit insgesamt vier Befestigungsstüpsel fixiert. Um das Trenngel vor Austrocknung zu schützen, wurden ca. 2 ml 0,1 % SDS pro Glasplatten-Paar langsam auf die Oberfläche des Trenngels pipettiert. Das Trenngel wurde für ca. 30 Minuten getrocknet. Währenddessen wurden 20 ml 5 % Sammelgel vorbereitet. Dieses enthielt 14 ml H₂O, 3,3 ml Acrylamid, 2,5 ml 1 M TRIS-Puffer mit einem pH von 6,8, 200 µl 10 % SDS, 200 µl 10 % APS sowie 20 µl TEMED. Nach der Trocknung des Trenngels wurden die 2 ml 0,1 % SDS pro Glasplatten-Paar verworfen und das Sammelgel wurde vorsichtig, um Luftblasen zu vermeiden, auf das Trenngel gegossen. Im Anschluss wurde in das noch flüssige Sammelgel ein Kamm gesteckt. Dann wurde das Gel erneut für ca. 30 Minuten trocknen gelassen. Zwischenzeitlich wurden die 24 Matrixproben vorbereitet. Zu den Proben wurden jeweils 6 µl von einem Sample Loading Buffer (5 x Laemmli sample buffer) pipettiert. Die Positivkontrolle wurde 1:20 mit Wasser

verdünnt. Danach wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C auf einem Thermoblock inkubiert. Hinterher wurden alle Proben kurz zentrifugiert. Der Kamm wurde nach 30 Minuten äußerst vorsichtig wieder aus dem Gel entfernt und die dabei entstandenen Taschen mit H₂O ausgespült. Beide Gele wurden in das Elektrophoresegerät (Hoefer™ Vertikal Kammer SE600 Basic, Hoefer Inc., Vereinigte Staaten) gestellt und fixiert. Das Gerät wurde ca. zu 2/3 mit 1 x Laufpuffer, welcher aus 25 mM TRIS, 192 mM Glycin (Glycin PUFFERAN® ≥99 %, p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) und 0,1 % SDS bestand, befüllt. In die erste Tasche wurden 6 µl eines Proteinmarkers (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc., Vereinigte Staaten) pipettiert. In den restlichen Taschen kamen die 22 Matrixproben, die Negativkontrolle und die verdünnte Positivkontrolle. Die Gele wurden mit 1 x Laufpuffer bedeckt, wobei darauf geachtet wurde, dass die maximale Markierung nicht überschritten wurde. Das Gerät wurde nun mit dem Elektrophorese-Netzteil (EPS-601 Electrophoresis Power Supply, GE HealthCare, Vereinigte Staaten) verbunden und für eine Stunde lang bei 60 mA und 102 V laufen gelassen (42). Nach einer Stunde wurden beide Gele vorsichtig aus den Glasplatten mit Hilfe eines Spatels gelöst und in zwei Becken, gefüllt mit einer Fixierlösung, gelegt. Die 1 L Fixierlösung bestand aus 100 ml 10 % Essigsäure, 300 ml Ethanol und 600 ml UHQ-Wasser. Pro Gel wurde so viel Fixierlösung benutzt, sodass die komplette Oberfläche benetzt war. Für ca. 15 Minuten wurden beide Becken auf ein Schüttelbrett (GFL™ Wipp-Schüttler 3013, LAUDA SCIENTIFIC GmbH, Deutschland) gestellt, um die Fixierlösung gleichmäßig auf die Oberflächen der Gele zu verteilen. Zum Schluss wurden sie bis zur Färbung über Nacht in den Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.3.3.3. Färbung

Nach der Elektrophorese wurden beide Gele am nächsten Tag nach der modifizierten Silberfärbung nach Heukeshoven (Tab. 2) in mehreren Schritten gefärbt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass ausschließlich hochwertige Chemikalien, frisch angesetzte Lösungen und ein Schüttelbrett für alle Schritte benutzt wurden. Es wurde so viel Lösung verwendet, bis die Oberfläche vollständig benetzt war.

Tab. 2: Silberfärbung nach Heukeshoven von zwei Gele nach der Größentrennung der Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, um vorhandene Proteine in Form von Banden sichtbar zu machen.

Schritt	Lösungszusammensetzung	Dauer
1. Sensibilisator	Pro 1 L: 2 g Natriumthiosulfat 5H ₂ O 68 g Natriumacetat 3H ₂ O in 700 ml UHQ-Wasser 300 ml 30 % Ethanol	≥1 Stunde bis zu über Nacht
2. Waschvorgang	UHQ-Wasser	3 × 20 Minuten
3. Silberfärbung	2 g/L Silbernitrat	30 Minuten
4. Waschvorgang	UHQ-Wasser	1 Minute
5. Entwicklung	Pro 1 L: 25 g Natriumcarbonat in UHQ-Wasser 100 µl 37 % Formaldehyd	2 × 20 Sekunden 2 × 3–8 Minuten
6. Pause	10 g/L Glycin	20 Minuten
7. Waschvorgang	UHQ-Wasser	2 × 15 Minuten

2.4. Datenauswertung

Alle Ergebnisse wurden in EXCEL (Excel 2019; Microsoft) gesammelt und werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Es erfolgt eine deskriptive Datenverarbeitung und somit ein Vergleich zwischen den Proben. Ebenso alle Grafiken wurden mit Excel erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Bakterielle DNA

Die Quantifizierung der bakteriellen DNA wurde anhand einer qPCR, basierend auf dem 16S Gen, und mit dem Mastermix „Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix“ durchgeführt. Folgende Proben konnten mit einem bce > 1 als positiv gewertet werden: Probe 1 (99 bce/cm²), Probe 8 (1.332 bce/cm²), Probe 14 (113.465 bce/cm²), Probe 18 (522 bce/cm²), Probe 19 (20 bce/cm²) und Probe 20 (2 bce/cm²).

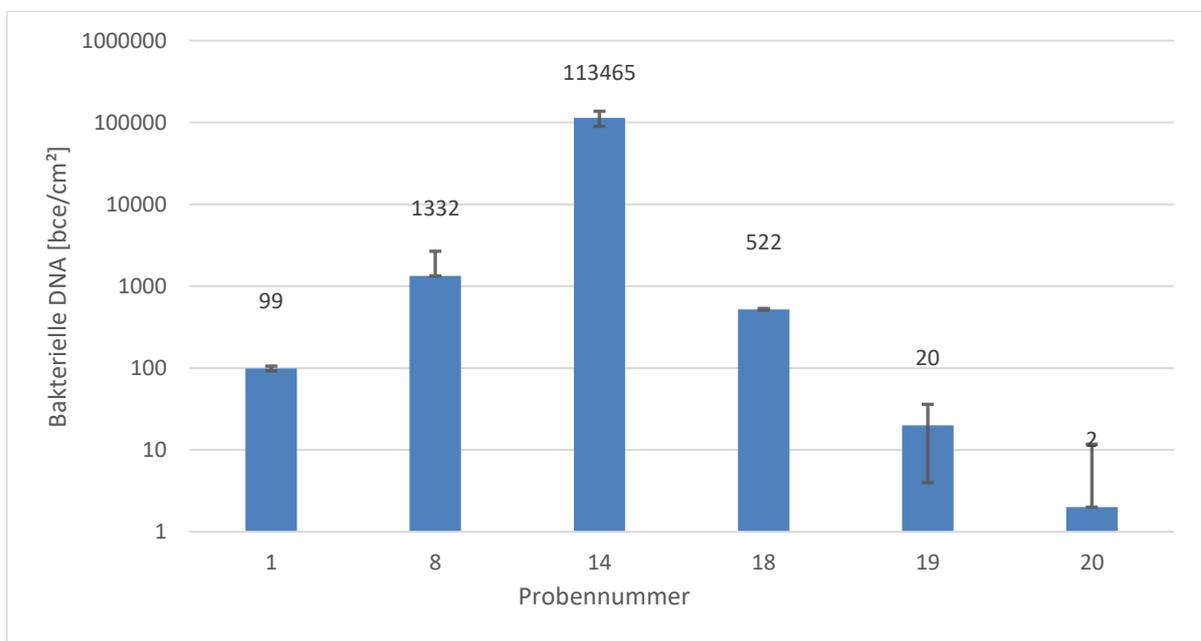


Abb. 3: Bakterielle DNA-Menge in bce/cm² von den positiv gewerteten Proben 1, 8, 14, 18, 19 und 20.

3.2. Matrix

3.2.1. Kohlenhydrate

Das Vorhandensein von Kohlenhydraten (in Glukose-Äquivalenten) wurde mit Hilfe eines Phenol-Schwefelsäure-Test und anschließender Absorptionsmessung mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 490 nm durchgeführt. Neben der Probe 23 als Positivkontrolle (803,41 ng/cm²) konnte Probe 14 (95,79 ng/cm²) und Probe 16 (205,47 ng/cm²) als Kohlenhydrat-positiv gewertet werden, da diese Proben oberhalb des Detektionslimits von 100 ng/50 µl lagen. Alle anderen Proben blieben unterhalb des Detektionslimits.

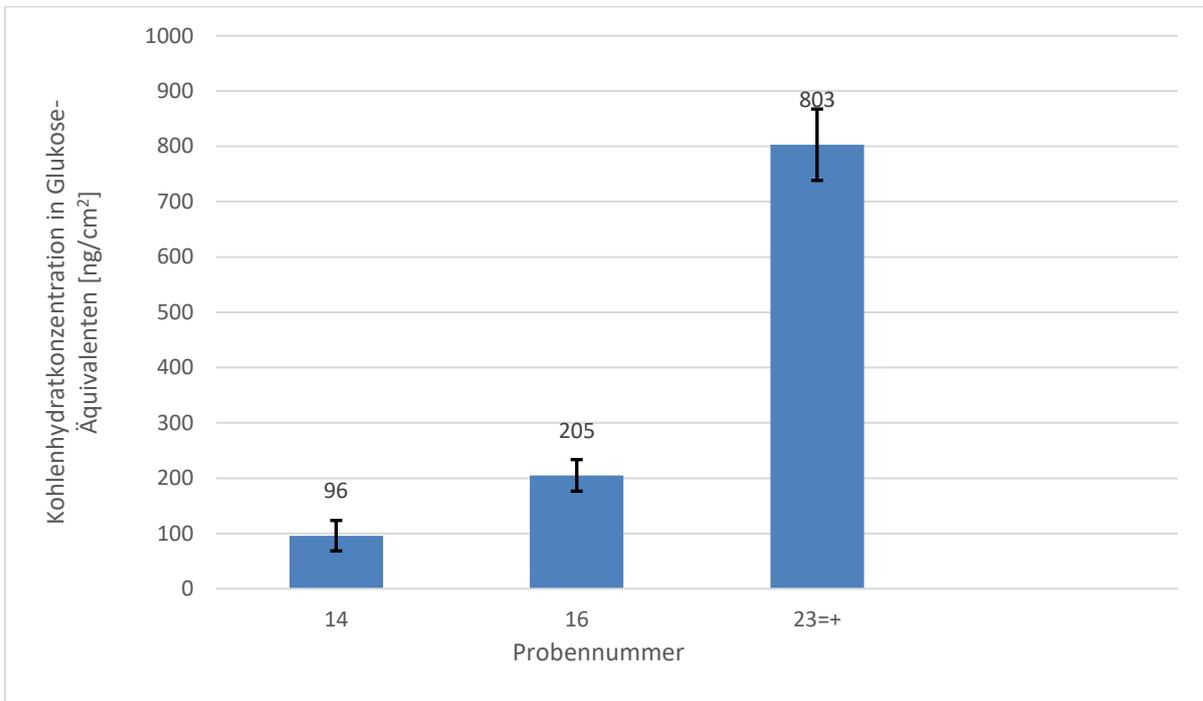


Abb. 4: Kohlenhydratgehalt in Glukose-Äquivalenten in ng/cm² von den Kohlenhydrat-positiv gewerteten Proben 14, 16 und 23 (Positivkontrolle = +), welche über dem Detektionslimit von 100 ng/50 µl lagen. Die restlichen Proben lagen unter dem Detektionslimit und wurden als negativ gewertet.

3.2.2. Extrazelluläre DNA

Die Analyse der extrazellulären DNA erfolgte quantitativ mittels Spektrometrie nach einer Aufkonzentration. Die Messungen der Positivkontrolle ergaben einen Mittelwert von 10,89 ng/µl +/- einer SD von 1,62, die NK war negativ auf eDNA. In Probe 14 konnte 9,54 ng/cm² eDNA +/- einer SD von 0,35 nachgewiesen werden, alle anderen 21 Proben waren negativ auf eDNA.

3.2.3. Proteine

Mit Hilfe von SDS-Page und darauffolgender Silberfärbung nach Heukeshoven zeigte von den 22 Proben nur die Probe 14, neben der Positivkontrolle und dem Proteinmarker, Banden auf dem Proteingel und konnte somit als Protein-positiv gewertet werden (Abb. 5).

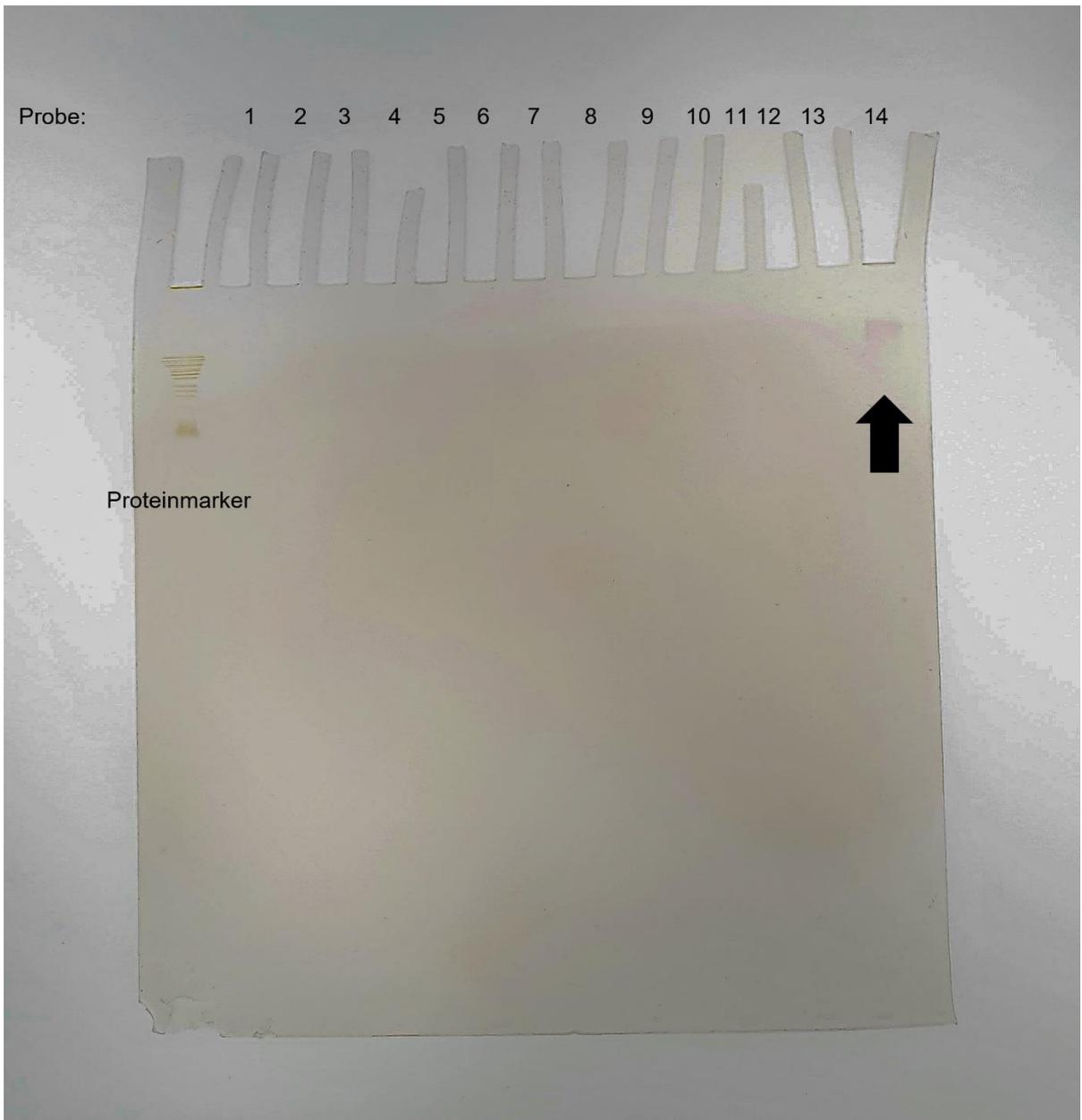


Abb. 5: Gel 1 mit einem Proteinmarker und den Proben 1–14. Die Größentrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (60 Minuten bei 60 mA und 102 V). Anschließend wurden die Proteine mittels Silberfärbung nach Heukeshoven durch das Auftreten von Banden sichtbar gemacht. Der schwarze Pfeil zeigt auf die vorhandenen und gefärbten Banden von Probe 14 und die somit einzige Protein-positiv gewertete Probe.

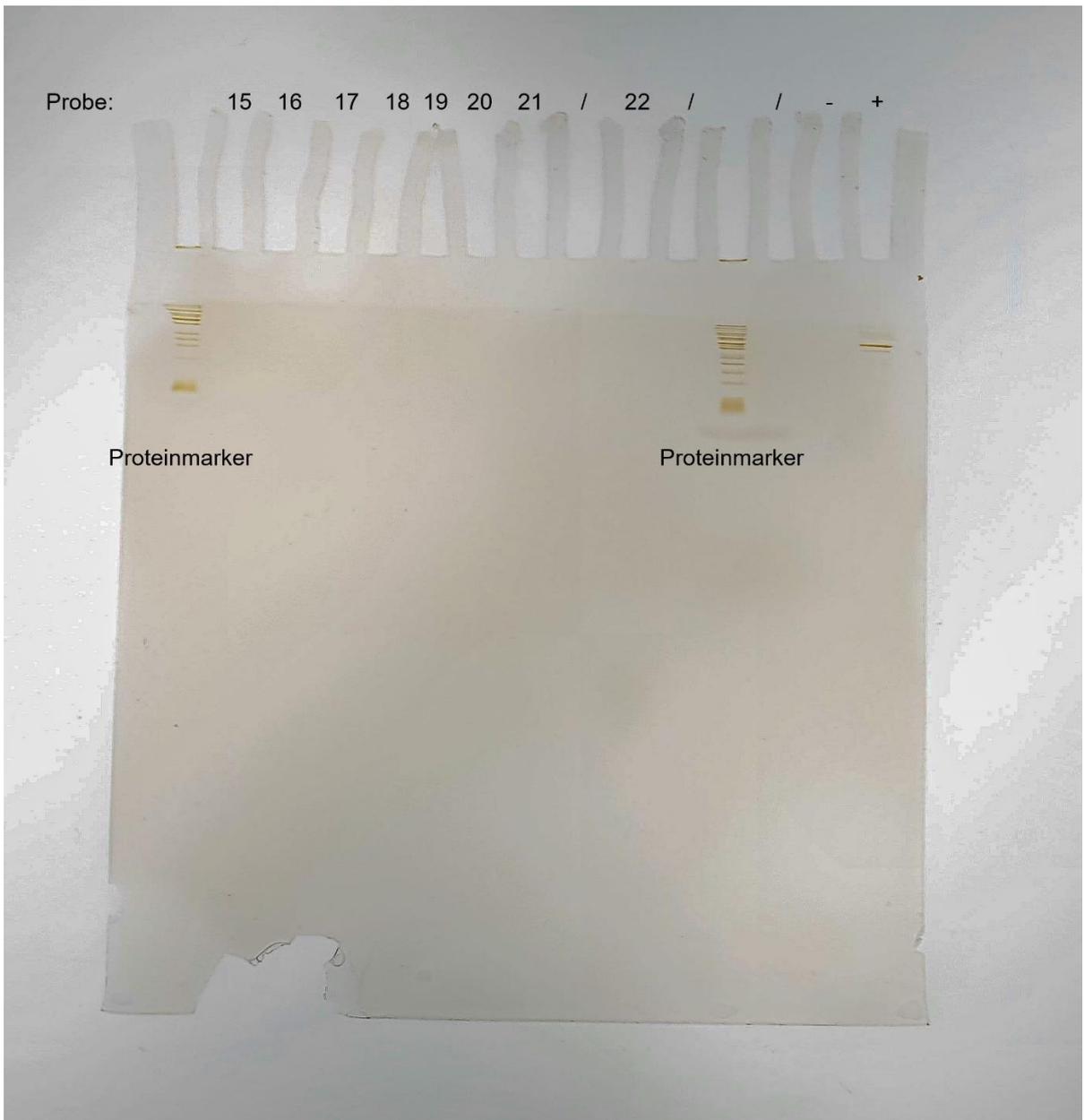


Abb. 6: Gel 2 mit zwei Proteinmarker, den Proben 15–22, leere Taschen (/), einer Negativ- (-) und einer Positivkontrolle (+). Die Größentrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (60 Minuten bei 60 mA und 102 V). Anschließend wurden die Proteine mittels Silberfärbung nach Heukeshoven durch das Auftreten von Banden sichtbar gemacht.

3.3. Inklusionskriterien und Zusammenfassung der Ergebnisse

Damit eine Probe als Biofilm-positiv gewertet wurde, musste bakterielle DNA in der qPCR nachgewiesen werden können und es mussten zumindest zwei von den drei analysierten Matrixkomponenten nachweisbar sein. Unter diesen Inklusionskriterien konnte eine Probe (Probe 14) als Biofilm-positiv gewertet werden. Bei Probe 14 konnte bakterielle DNA (113.465 bce/cm²) sowie alle drei Matrixkomponenten (Proteine, eDNA, Kohlenhydrate) nachgewiesen werden. Die Probe 14 wurde im Reifungsraum 2 vom Klimagerät entnommen und stellt somit eine nicht-produktberührende Probe dar.

Tab. 3: Zusammenfassung der Ergebnisse. Grüne Felder zeigen den positiven Nachweis von bakterieller DNA, Kohlenhydrate, eDNA oder Proteine an. Orange Felder zeigen Biofilm-positiv gewertete Proben von dieser Arbeit an. Die Menge der bakteriellen DNA unterscheidet sich anhand der Farbintensität der grünen Felder, wobei Probe 14 mit 113.465 bce/cm² (dunkelgrünes Feld) am meisten bakterielle DNA und Probe 20 mit 2 bce/cm² (hellgrünes Feld) am wenigsten bakterielle DNA enthielt. Gelbe Felder und das + Zeichen zeigen Biofilm-positive Proben von dem vorangegangenen Projekt im Jahr 2020 (Lourenco et al. (2023)) an. Das - Zeichen steht für Biofilm-negative Proben und n.b. bedeutet „nicht beprobt“.

		Bakterielle DNA	Kohlenhydrate	eDNA	Proteine	Biofilm-positiv im Projekt 2020
Fertiger 1 (Innen)	1					-
Fertiger 1 (Messer)	2					+
Fertiger 1 (Außenkante Öffnung)	3					+
Fertiger 4 (Innen)	4					-
Fertiger 4 (Messer)	5					-
Fertiger 4 (Molkekorb außen)	6					n.b.
Vorpresswanne (Presse 8, Abfüller innen)	7					n.b.
Vorpresswanne (Presse 8, blaues Band innen)	8					n.b.
Vorpresswanne (Presse 8, Pressdeckel)	9					n.b.
Bruchleitung (Innen bei Käsepresse 6 und 7)	10					-
Waschmaschine (Zone A)	11					+
Waschmaschine (Zone B)	12					n.b.
Waschmaschine (Zone C)	13					n.b.
Klimagerät (Reifungsraum 2)	14					+
Presse 7 (Wanne innen)	15					n.b.
Presse 7 (Pressdeckel)	16					n.b.
Käseformen (über Nacht in Formenlager)	17					-
Verweiler 10 (Abtropftasse)	18					n.b.
Käseform (direkt nach Waschmaschine)	19					n.b.
Presse 7 (Käse Kassette)	20					n.b.
Negativkontrolle (Betrieb)	21					n.b.
Negativkontrolle (Labor)	22					n.b.

4. Diskussion

Biofilme sind in der Milchindustrie ein relevantes Thema, da sie eine Bedrohung für die Qualität, Stabilität und Sicherheit von Milch und Milchprodukten darstellen (43). Milch und Milchprodukte können durch verderbliche Mikroorganismen, die Gase, Säuren oder extrazelluläre Enzyme produzieren, an Wert verlieren. Darüber hinaus könnten angesiedelte pathogene Mikroorganismen Erkrankungen bei Menschen verursachen (44). So konnten bereits viele lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche in Verbindung mit Biofilmen gebracht werden, weil sie hauptsächlich auf Oberflächen der Produktionsausrüstungen zu finden sind (45). Eine Rekontamination trotz korrekt durchgeführter Reinigung ist aufgrund der Widerstandsfähigkeit von Biofilmen ebenso nicht auszuschließen (46). Molkereianlagen bieten eine Vielzahl optimaler Bedingungen für die Biofilmbildung, wie z.B. geeignete Temperaturbereiche für das Wachstum, Feuchtigkeit und einen hohen Nährstoffgehalt (30). In der Molkerei, die in dieser Arbeit beprobt wurde, wurden bereits im Oktober 2020 28 Proben gezogen und auf Biofilme untersucht. Dabei konnten bei 60 % der Proben Biofilme detektiert werden. Die 28 Proben wurden im Reifekeller und im Produktionsbereich genommen, jedoch mit Fokus auf das Belüftungssystem. Nach dem genannten Projekt ergriff die Molkerei Einzelmaßnahmen, um vorhandene Biofilme in der Produktion zu eliminieren. Hierzu gehörte eine händische Nachreinigung der Biofilm-positiven Stellen sowie die Erstellung eines internen Hygienekonzepts aufgrund der Beprobungen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Nachbeprobung dieser Molkerei von produktberührenden und nicht-produktberührenden Risikostellen nach der Reinigung und Desinfektion, um so die Wirksamkeit der ergriffenen Maßnahmen zu überprüfen. Es wurden von den insgesamt 28 Stellen, welche 2020 beprobt wurden, neun Stellen erneut beprobt, wobei der Fokus dieses Mal auf produktberührende Stellen in der Produktion lag. Die Untersuchungsmethoden der Proben und die Definition von Biofilm-positiven Proben stützten sich auf bereits publizierte Methoden von Wagner et al. (2020), deren Studie eine Fleischverarbeitungs Umgebung auf das Vorhandensein von Biofilmen analysiert hat (42). Die verwendeten Tupfer waren an der Spitze mit Nylonfasern beschichtet und eignen sich, wie in der Studie von Maes et al. (2017) beschrieben, besonders gut für die chemische Analyse von EPS. Das Tupfermaterial beeinflusst im Gegensatz zu der Sponge-Stick-Methode mittels Zelluloseschwamm die Analyse von Kohlenhydraten und Proteinen nicht (45). Es wird in der Studie jedoch auch erwähnt, dass die Zelluloseschwämme numerisch aber nicht signifikant geeigneter sind für das Einfangen und Kultivieren von Mikroorganismen als die Zellschaber-Tupfer-Methode,

welche in dieser Arbeit angewendet wurde (45). In dieser Arbeit wurde allerdings für die Analyse der Bakterien eine kulturierungsunabhängige Methode (qPCR) gewählt. Um als Biofilm-positive Probe gewertet zu werden, musste in der Probe sowohl bakterielle DNA als auch mindestens zwei der drei Matrixkomponenten (Kohlenhydrate, eDNA, Proteine) nachweisbar sein. Diese Definition einer Biofilm-positiven Probe gilt als zuverlässiger als die Definition, dass kultivierbare Bakterien und mindestens eine Matrixkomponente nachgewiesen werden müssen (42). Denn mit dieser Definition lässt man außer Acht, dass in Lebensmittelherstellungsumgebungen Rückstände von Rohstoffen oder verarbeiteten Lebensmitteln auftreten können (Matrixbezogene Produkte) und es dadurch zu einer Überschätzung der Biofilmanzahl und somit zu falsch positiven Ergebnissen kommen könnte (42). Dies könnte auch erklären, warum in der vorliegenden Arbeit in einer einzigen Probe nur Kohlenhydrate ohne weitere Matrixbestandteile oder bakterieller DNA gefunden werden konnte. Viele bisherige Studien konzentrierten sich bei der Identifizierung von Biofilmen nur auf die Analyse der Bakterien (47,48). Lediglich drei Studien, welche Fleischverarbeitungsbetriebe, Masthähnchenfarmen und weitere Lebensmittelverarbeitungsbetriebe (z.B. Molkereien) beprobten, konnten gefunden werden, die sowohl die Analyse von Bakterien als auch die chemische Analyse der Matrixkomponenten miteinbeziehen (42,45,49). Zwei weitere Studien, die sich unter anderem mit der Rolle von Biofilmen in Euterentzündungen von Rindern und mit den Überlebensmechanismen von klinisch relevanten Mikroorganismen in Biofilmen beschäftigten, beschreiben die Untersuchung der Zusammensetzung der Matrix mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (50,51). Es sind zwar geringere Vergrößerungen als bei dem Rasterelektronenmikroskop möglich, jedoch ist es in der Lage die Matrix als räumliche Struktur unverändert und intakt zu visualisieren (50,51). Allerdings konnte keine vergleichbare publizierte Studie gefunden werden, welche sich insbesondere mit der Analyse von Biofilmen (Bakterien und Matrixkomponenten) von produktberührenden Stellen und nicht-produktberührenden Stellen in Molkereien auseinandergesetzt hat. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich die Analyse der EPS-Komponenten schwierig gestaltet. In dieser Arbeit wurden insgesamt 20 unterschiedliche Stellen (produktberührende und nicht-produktberührende) beprobt. Wie auch in der Studie von Srey et al. (2013) beschrieben, wurden jene produktberührenden Stellen beprobt, welche oft mit der Bildung von Biofilmen in Verbindung gebracht werden konnten, wie beispielsweise Transportrohre, Behälter und Zubehör (22). Verschiedene Teile von Milchverarbeitungsanlagen, wie Lagertanks, Außenwände von Pumpen, Milchleitungen, Abfüllanlagen, Milchsilos etc. sind besonders

gefährdet für Biofilmbildung (30). Jene genannten Teile, welche in der Studie von Fysun et al. (2018) erwähnt wurden, spiegeln auch die Probenahmestellen von der vorliegenden Arbeit wider (Fertiger, Bruchleitung, Abfüller der Vorpresswanne, Presse, Verweiler). Oberflächen, die gerne in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden und auf denen bereits Biofilme nachgewiesen werden konnten, sind unter anderem Edelstahl, Polytetrafluorethylen (PTFE), Glas und Aluminium (30). In den Ergebnissen von der Studie von Fysun et al. (2018), welche sich mit dem Einfluss von Faktoren auf die Biofilmbildung in einem Testschlauch zur Abfüllung in Molkereien beschäftigte, konnte gezeigt werden, dass die bakteriellen Zusammensetzungen von der Milch, als auch Strömungsverhältnisse und Materialtyp die Biofilmbildung beeinflussten (30). Beispielsweise konnte eine höhere Adhäsion bei laminaren Strömungsverhältnissen und auf hydrophoben PTFE-Oberflächen im Vergleich zu turbulenten Strömungsverhältnissen und hydrophilen Edelstahloberflächen gezeigt werden. Allerdings gibt es nach wie vor widersprüchliche Ansichten bezüglich der Materialhydrophobie und dessen Auswirkung auf die Adhäsion von Bakterien (30). Nicht-produktberührenden Stellen wurden ausgewählt, da diese Stellen durch Kreuzkontaminationen eine Gefahr darstellen könnten, wie beispielsweise die Waschmaschine und das Klimagerät. In anderen Publikationen wird jedoch selten auf nicht-produktberührende Stellen eingegangen (44,45,52), wodurch jedoch potenzielle indirekte Kontaminationsquellen vernachlässigt werden. Das zeigt die Studie von Wagner et al. (2020), in welcher Biofilme in Wasserschläuche nachgewiesen und somit als Biofilm-Hotspots identifiziert werden konnten (42). Da Wasserschläuche häufig für das Wegspülen von Desinfektionsmittelresten verwendet werden, könnten Oberflächen, die für sauber und desinfiziert gehalten wurden, eine Übertragung von Mikroorganismen auf Lebensmitteln verursachen (42). Weiters ist die Biofilmverbreitung über Aerosole beschrieben (53). Die Studie von Lourenco et al. (2023), welche die vorangegangene Probennahme in dieser Molkerei durchführte und sich mit dem Belüftungssystem beschäftigte, legt auch dar, dass es z.B. durch die Luftzirkulation von Klimageräten zur Verteilung von Bakterien aus Biofilmen kommen kann und dadurch saubere Stellen eine Kreuzkontamination erfahren könnten (46). Daher ist besonders die Biofilm-positive Probe 14 vom Klimagerät von Bedeutung aufgrund der Möglichkeit einer Kreuzkontamination über die Luft. Klimageräte sind außerdem selten Teil der routinemäßigen Reinigungsvorgänge in Molkereien und stellen somit ein optimales Reservoir dar (46). Auch Abflüsse können unterschiedliche Mikroorganismen, wie *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, etc. beherbergen (47). Aufgrund dessen sollten nicht-produktberührende Stellen auch miteinbezogen werden, da diese ebenso

Biofilme beherbergen können. Eine Möglichkeit der Rekontamination von Milch und Milchprodukten selbst besteht durch Gram-negative psychrotrophe Bakterien, die zwar während der Pasteurisierung abgetötet werden, jedoch später erneut in die Anlagen gelangen können. Darüber hinaus können Sporen von Bakterien die Pasteurisierung überleben und z.B. an Sackgassen anheften und zur Biofilmbildung führen. Insbesondere die Abfüllanlage stellt eine wichtige Quelle der Rekontamination dar (30).

In der vorliegenden Arbeit konnte nach der Umstellung des Reinigungskonzeptes eine von den insgesamt 22 untersuchten Proben (5 %) als Biofilm-positiv gewertet werden. Sowohl bakterielle DNA als auch alle drei Matrixkomponenten (Kohlenhydrate, Proteine und eDNA) konnten vom Klimagerät im Reifungsraum 2 nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde in der vorangegangenen Studie im Oktober 2020 bei 17 von 28 Proben (60 %) ein Biofilm nachgewiesen (46). Die Probe vom Klimagerät (Reifungsraum 2) konnte 2020 bereits als Biofilm-positiv gewertet werden, und enthielt 2020 vorwiegend *Muribaculaceae*, *Lactobacillus*, *Desulfovibrio* und *Parasutterella*. Entweder haben die Einzelmaßnahmen der Molkerei an dieser Oberfläche nicht den gewünschten Erfolg erzielt und der Biofilm konnte weiterhin bestehen, oder die Einzelmaßnahmen waren erfolgreich, aber das Reinigungsintervall des Klimageräts war zu lang, sodass sich bereits ein neuer Biofilm bilden konnte. Alle anderen neuerlich beprobten Stellen, wie die Probe 2 (Fertiger 1 Messer), Probe 3 (Fertiger Außenkante Öffnung) und Probe 11 (Waschmaschine Zone A) konnten im Vergleich zu der ersten Beprobung im Jahr 2020, wo sie Biofilm-positive Proben darstellten, nun als Biofilm-negativ gewertet werden (46). Probe 1 (Fertiger 1 Innen), Probe 4 (Fertiger 4 Innen), Probe 5 (Fertiger 4 Messer), Probe 10 (Bruchleitung Innen) und Probe 17 (Käseformen) waren sowohl im Jahr 2020 als auch nun Biofilm-negativ. In der vorliegenden Arbeit erfolgte keine weitere Untersuchung der Bakterienspezies, jedoch konnte im Jahr 2020 im Produktionsbereich vor allem Gattungen, wie z.B. *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, geringe Anteile von *Brevibacterium*, *Psychrobacter* und *Candidatus Arthromitus* gefunden werden. In der gesamten Produktionskette wurden Gattungen, wie *Muribacalaceae*, *Halomonas*, *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Parasutterella* detektiert. Beinahe fast alle Proben wurden vor allem entweder von *Muribacalaceae* oder *Halomonas* dominiert (46). Gattungen, wie z.B. *Psychrobacter*, *Halomonas*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* und *Serratia* konnten auch in weiteren Studien in Biofilmen gefunden werden (47,48,54). Maes et al. (2017) fanden in deren Studie, welche Oberflächen von acht verschiedene belgische Lebensmittelunternehmen (davon zwei Molkereien) nach der Reinigung und Desinfektion auf

Biofilme untersuchten, dass 17 % der analysierten Oberflächen einen Biofilm beherbergten (45). Ein Biofilm wurde in der Studie definiert durch das Vorhandensein von Bakterien und mindestens einer Matrixkomponente (Kohlenhydrate oder Proteine oder Uronsäure). In zwei Proben konnten Bakterien und jeweils zwei Matrixkomponenten (Proteine/Kohlenhydrate, Proteine/Uronsäure) gefunden werden. Jedoch konnte in nur einer von 165 Proben, Bakterien und alle drei analysierten chemischen Substanzen nachgewiesen werden (45). Die Biofilm-positive Probe, welche auch alle drei Matrixkomponenten aufwies, enthielt 180,2 ng/cm² (Medianwert) Kohlenhydrate, was im Vergleich zu den Kohlenhydrat-positiven Proben (Probe 14 und 16) in der vorliegenden Arbeit mit 95,79 ng/cm² und 205,47 ng/cm² Ähnlichkeit aufweist. Der höchste Kohlenhydratgehalt in der Studie von Maes et al. (2017) wurde mit 4.323,80 ng/cm² detektiert (45). In der Studie von Wagner et al. (2020) reichte der Kohlenhydratgehalt von 1.090 ng/cm² (Biofilm-negative Probe, Probenahme während Produktion) bis 197.880 ng/cm² (Biofilm-positive Probe, Probenahme nach Reinigung und Desinfektion) Glukoseäquivalente (42). Die Anteile der EPS-Bestandteile können jedoch laut Flemming et al. (2010) je nach Spezieszusammensetzung und externen Faktoren variieren (11). Die Kohlenhydrat-positiven Proben stammten in der Studie von Maes et al. (2017) von Oberflächen der Fleischverarbeitung und Saucenverarbeitung und die in der Studie von Wagner et al. (2020) ebenso von Oberflächen der Fleischverarbeitung im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, wo Oberflächen der Milchverarbeitungsumgebung beprobt wurden (42,45). Die unterschiedlichen beprobten Umgebungen und die unterschiedlichen Spezieszusammensetzungen der Biofilme je nach Art der Lebensmittelproduktion könnten Gründe für die großen Kohlenhydrat-Mengen-Unterschiede sein.

Mehrere produktberührende Proben (Probe 1, 8, 18, 19 und 20) in der vorliegenden Studie beinhalteten trotz vorheriger Reinigung und Desinfektion bakterielle DNA (> 1 bce/cm²) aber keine Biofilmkomponenten. Dies könnte daran liegen, dass die qPCR auch die DNA von lysierten Zellen detektieren kann (42). Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass zwar Bakterien vorhanden waren, diese aber noch keinen Biofilm gebildet haben (46). Daher stellen diese Stellen für eine eventuelle zukünftige Biofilmbildung ein Risiko dar und sollten regelmäßig überwacht werden. Die Biofilm-positive Probe 14 hatte mit 113.465 bce/cm² bakterielle DNA die höchste Menge von allen Proben, was bestätigt, dass Biofilme eine hohe Zelldichte aufweisen (10). Dies würde im Umkehrschluss auch unterstreichen, dass die oben angeführten Proben, welche ausschließlich wenige Bakterien (bce/cm²) beinhalteten, noch keinen Biofilm darstellten (10). Es wurde jedoch ausschließlich nur eine quantitative Analyse

mittels qPCR der Bakterien und keine Speziesidentifizierung durchgeführt. Deshalb kann keine Aussage über die darin enthaltenen Bakterien oder eventuelle Krankheitserreger getroffen werden. Zwei Begründungen für die Quantifizierung der Bakterien mittels der kulturunabhängigen qPCR sind, dass sie eine Einschätzung der Bakterienanzahl als bce/cm² zulässt und dass bei der qPCR auch lebensfähige, aber nicht kultivierbare Bakterien (VBNC) detektiert werden, da es im Labor oft schwierig ist, die gleiche Umgebung für Bakterien (Nährmedien, selektive Agar), wie sie in Biofilme besteht, abzubilden (10,42).

Wie erwähnt wurde nur in Probe 14 eDNA mit einer Konzentration von 9,54 ng/cm² nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, dass das Protokoll die eDNA-Menge sogar etwas unterschätzt, da die bekannte Konzentration der Positivkontrolle (15 ng/μl) höher als die gemessene Konzentration (10,89 ng/μl) war. Zum Vergleich wiesen Biofilm-positive Proben in der Studie von Wagner et al. (2020) eDNA-Mengen von 2.030 ng/cm² (Probennahme nach Reinigung und Desinfektion) bis 61.500 ng/cm² (Probennahme während Produktion) auf (42). Die Biofilm-positiven Proben mit der niedrigsten und höchsten eDNA-Menge wiesen jedoch, wie von der Abbildung der Studie entnommen, eine ähnlich hohe bakterielle DNA-Menge von ca. 7 log bce/cm² auf (42). Die Biofilm-positive Probe in der vorliegenden Arbeit lagen mit 5 log bce/cm² darunter. Die Werte zeigen allerdings gut, dass keine offensichtliche Korrelation zwischen bakterieller DNA-Menge und eDNA-Menge besteht. Einer der Gründe für die großen eDNA-Mengen-Unterschiede könnte sein, dass je nach Bakterienart der Ursprung der eDNA unterschiedlich sein kann (11). Die eDNA vom *Gammaproteobacteria*-Stamm F8 weist beispielsweise nicht nur Ähnlichkeiten sondern auch deutliche Unterschiede zur genomischen DNA auf (11). Diese Tatsache spricht dafür, dass vorhandene eDNA nicht nur den Rest von lysierten Zellen darstellt sondern auch aktiv ausgeschieden werden kann (11). Der Proteinnachweis erfolgte durch eine Größentrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung nach Heukeshoven. Anhand des verwendeten Proteinmarkers ließ sich darauf schließen, dass die vorhandenen angefärbten Proteine der Biofilm-positiven Probe 14, ein Molekulargewicht zwischen 100 und 200 Kilodalton aufwiesen. Daher ist auszuschließen, dass es sich hierbei fälschlicherweise um die Detektion von Milchproteinen handelte, da die Kaseine, welche die Haupt-Proteinfraktion der Milch darstellen, von der Saanenziege und vom Holsteinrind ein Molekulargewicht zwischen 19 und 35 Kilodalton aufweisen (55).

Mit der Nachbeprobung der Molkerei und der Identifizierung von negativen Biofilm-Stellen, welche zuvor positiv waren, lässt sich sagen, dass die ergriffenen Einzelmaßnahmen an

diesen Stellen erfolgreich waren. Es sollte jedoch auf die regelmäßige Reinigung der Klimaanlage geachtet werden, da es sonst zu Kreuzkontaminationen kommen könnte. Biofilme bestehen aus einer komplexen Matrix und die meisten bisherigen Methoden zur Untersuchung von Mikroorganismen in der Lebensmittelindustrie berücksichtigen dies nicht (30). Daher erfordert es weitere Studien über die Probennahme, raschen Analyse, Entwicklung und Zusammensetzung von Biofilmen inklusive deren Matrixkomponenten in Milchverarbeitungsumgebungen, um Kontaminationen mit Biofilmen zu verhindern beziehungsweise erfolgreich bekämpfen zu können und somit die Sicherheit von Produkten zu gewährleisten.

5. Literaturverzeichnis

1. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*. 2017;125(4):272–5.
2. Wingender J, Flemming HC. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214(6):417–23.
3. Flemming HC, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(4):247–60.
4. Halan B, Buehler K, Schmid A. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends Biotechnol*. 2012;30(9):453–65.
5. Winkelströter LK, Teixeira FB dos R, Silva EP, Alves VF, De Martinis ECP. Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. *Microb Ecol*. 2014;68(1):35–46.
6. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *Apmis*. 2017;125(4):353–64.
7. Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(10):621–35.
8. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens: Leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res*. 2014;78(2):110–6.
9. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711–45.
10. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563–75.
11. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623–33.
12. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian J Microbiol*. 2021;52(4):1701–18.
13. Araújo EA, de Andrade NJ, da Silva LHM, de Carvalho AF, de Silva CAS, Ramos AM. Control of microbial adhesion as a strategy for food and bioprocess technology. *Food Bioprocess Technol*. 2010;3(3):321–32.
14. Zhao X, Zhao F, Wang J, Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives. *RSC Adv*. 2017;7(58):36670–83.

15. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *Int J Food Microbiol.* 1998;42(1–2):9–27.
16. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol.* 2010;109(4):1117–31.
17. Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(1):7–12.
18. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187–209.
19. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J Bacteriol.* 2007;189(22):7945–7.
20. Seviour T, Derlon N, Dueholm MS, Flemming HC, Girbal-Neuhauser E, Horn H, et al. Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis. *Water Res.* 2019;151:1–7.
21. Nielsen PH, Jahn A. Extraction of EPS. *Microb Extracell Polym Subst.* 1999;49–72.
22. Srey S, Jahid IK, Ha S Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control.* 2013;31(2):572–85.
23. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):510–43.
24. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect.* 2006;64(4):313–25.
25. Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Lwt.* 2010;43(4):573–83.
26. Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo A. Microbial biofilms in the food industry—a comprehensive review. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(4):1–31.
27. Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Møretrø T, et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* 2014;97(3):298–309.

28. Galié S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front Microbiol.* 2018;9:898.
29. Álvarez-Ordóñez A, Alvseike O, Omer MK, Heir E, Axelsson L, Holck A, et al. Heterogeneity in resistance to food-related stresses and biofilm formation ability among verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Int J Food Microbiol.* 2013;161(3):220–30.
30. Fysun O, Kern H, Wilke B. Food and Bioproducts Processing Evaluation of factors influencing dairy biofilm formation in filling hoses of food-processing. *Food Bioprod Process.* 2018;113:39–48.
31. Giaouris E, Heir E, Desvaux M, Hébraud M, Møretrø T, Langsrud S, et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2015;6:841.
32. Bastam MM, Jalili M, Pakzad I, Maleki A, Ghafourian S. Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk. *Vet Med Sci.* 2021;7(6):2445–9.
33. AMA-Marketing. Entwicklung des Pro-Kopf-Verbrauches von Konsummilch* in Österreich (in kg), Entwicklung des Pro-Kopf-Verbrauches von Obers & Rahm in Österreich (in kg), Entwicklung des Pro-Kopf-Verbrauches von Butter in Österreich (in kg), Entwicklung des Pro-Kopf-Verbrauches von Käse in Österreich (in kg). Agrarmarkt Austria.
34. Olivier SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis.* 2005;2(2):115–29.
35. Teh KH, Flint S, Palmer J, Andrewes P, Bremer P, Lindsay D. Biofilm- An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *Int Dairy J.* 2014;34(1):32–40.
36. Teh KH, Flint S, Palmer J, Lindsay D, Andrewes P, Bremer P. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *Int Dairy J.* 2011;21(10):742–7.
37. Masiello SN, Martin NH, Trmčić A, Wiedmann M, Boor KJ. Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci.* 2016;99(1):130–40.

38. Malek F, Moussa-Boudjemâa B, Khaouani-Yousfi F, Kalai A, Kihel M. Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *African J Microbiol Res.* 2012;6(17):3836–44.
39. Giaouris E, Simoes M, Dubois-Brissonnet F. The role of biofilms in the development and dissemination of microbial resistance within the food industry. *Foods.* 2020;9(6):816.
40. Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* 2015;10(11):1743–50.
41. Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib NE. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol.* 2014;196(7):453–72.
42. Wagner EM, Pracser N, Thalgueter S, Fischel K, Rammer N, Pospíšilová L, et al. Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. *Int J Food Microbiol.* 2020;328:108668.
43. Ostrov I, Paz T, Shemesh M. Robust biofilm-forming bacillus isolates from the dairy environment demonstrate an enhanced resistance to cleaning-in-place procedures. *Foods.* 2019;8(4):134.
44. Goetz C, Larouche J, Aristizabal MV, Niboucha N, Jean J. Efficacy of Organic Peroxyacids for Eliminating Biofilm Performed by Microorganisms Isolated from Dairy Processing Plants. *Appl Environ Microbiol.* 2022;88(4):1–10.
45. Maes S, Huu SN, Heyndrickx M, Van Weyenberg S, Steenackers H, Verplaetse A, et al. Evaluation of two surface sampling methods for microbiological and chemical analyses to assess the presence of biofilms in food companies. *J Food Prot.* 2017;80(12):2022–8.
46. Lourenco A, Quijada NM, Neubauer V, Thalgueter S, Voglauer EM, Wagner M, Burgess K, McAuliffe O, Rychli K. Culture-Independent Characterization of the Biofilm Microbiota Present in the Environment of Cheese Producing Facilities. *Manuskript Prep.* 2023;
47. Dzieciol M, Schornsteiner E, Muhterem-Uyar M, Stessl B, Wagner M, Schmitz-Esser S. Bacterial diversity of floor drain biofilms and drain waters in a *Listeria monocytogenes* contaminated food processing environment. *Int J Food Microbiol.*

- 2016;223:33–40.
48. Røder HL, Raghupathi PK, Herschend J, Brejnrod A, Knøchel S, Sørensen SJ, et al. Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiol.* 2015;51:18–24.
 49. Maes S, Vackier T, Huu SN, Heyndrickx M, Steenackers H, Sampers I, et al. Occurrence and characterisation of biofilms in drinking water systems of broiler houses. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):77.
 50. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167–93.
 51. Pedersen RR, Krömker V, Bjarnsholt T. Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Front Vet Sci.* 2021;8:656810.
 52. Di Ciccio P, Rubiola S, Panebianco F, Lomonaco S, Allard M, Bianchi DM, et al. Biofilm formation and genomic features of *Listeria monocytogenes* strains isolated from meat and dairy industries located in Piedmont (Italy). *Int J Food Microbiol.* 2022;378:109784.
 53. Gagnière S, Auvray F, Carpentier B. Spread of a green fluorescent protein-tagged *Pseudomonas putida* in a water pipe following airborne contamination. *J Food Prot.* 2006;69(11):2692–6.
 54. Wagner EM, Fischel K, Rammer N, Beer C, Lena A, Conrady B, et al. Bacteria of eleven different species isolated from biofilms in a meat processing environment have diverse biofilm forming abilities. *Int J Food Microbiol.* 2021;349:109232.
 55. Zhang M, Sun X, Cheng J, Guo M. Analysis and Comparison of Nutrition Profiles of Canine Milk with Bovine and Caprine Milk. *Foods.* 2022;11(3):472.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1:** Entwicklungsprozess eines Biofilms, der sich in fünf Phasen einteilen lässt: I) Anheftung von Planktonzellen = reversible Anheftung, II) Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) = irreversible Anheftung, III) Mikrokoloniebildung, IV) Reifung und V) Dispersion. Adaptiert nach Winkelströter et al. (2014). 3
- Abbildung 2:** Anleitung zur Probennahme von Biofilmproben von den in der Tab. 1 genannten Probennahmestellen. Es wurde auf eine hygienische Beprobung geachtet und von jeder Stelle ca. 400 cm² unter Druck mit einem Zellschaber und zwei Tupfer beprobt. Der Zellschaber und die beiden Tupfer wurden an der Sollbruchstelle abgetrennt und im Anschluss in ein 50 ml Röhrchen, gefüllt mit 10 ml 0,25-fache Ringer-Lösung, gegeben und gekühlt für die Weiterverarbeitung in das Labor gesandt. 17
- Abbildung 3:** Bakterielle DNA-Menge in bce/cm² von den positiv gewerteten Proben 1, 8, 14, 18, 19 und 20. 26
- Abbildung 4:** Kohlenhydratgehalt in Glukose-Äquivalenten in ng/cm² von den Kohlenhydrat-positiv gewerteten Proben 14, 16 und 23 (Positivkontrolle = +), welche über dem Detektionslimit von 100 ng/50 µl lagen. Die restlichen Proben lagen unter dem Detektionslimit und wurden als negativ gewertet. 27
- Abbildung 5:** Gel 1 mit einem Proteinmarker und den Proben 1–14. Die Größentrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (60 Minuten bei 60 mA und 102 V). Anschließend wurden die Proteine mittels Silberfärbung nach Heukeshoven durch das Auftreten von Banden sichtbar gemacht. Der schwarze Pfeil zeigt auf die vorhandenen und gefärbten Banden von Probe 14 und die somit einzige Protein-positiv gewertete Probe. 28
- Abbildung 6:** Gel 2 mit zwei Proteinmarker, den Proben 15–22, leere Taschen (/), einer Negativ- (-) und einer Positivkontrolle (+). Die Größentrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (60 Minuten bei 60 mA und 102 V). Anschließend wurden die Proteine mittels Silberfärbung nach Heukeshoven durch das Auftreten von Banden sichtbar gemacht. 29

Tabelle 1: Probennahmestellen entlang der Käseproduktion, an denen Biofilmproben genommen wurden. Grüne Felder stehen für produktberührende Stellen, rote Felder für nicht-produktberührende Stellen und gelbe Felder kennzeichnen diejenigen Entnahmestellen, welche bereits im Jahr 2020 in einem vorangegangenen Projekt von Lourenco et al. (2023) untersucht und nun in dieser Arbeit erneut beprobt wurden..... 16

Tabelle 2: Silberfärbung nach Heukeshoven von zwei Gele nach der Größentrennung der Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, um vorhandene Proteine in Form von Banden sichtbar zu machen..... 25

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse. Grüne Felder zeigen den positiven Nachweis von bakterieller DNA, Kohlenhydrate, eDNA oder Proteine an. Orange Felder zeigen Biofilm-positiv gewertete Proben von dieser Arbeit an. Die Menge der bakteriellen DNA unterscheidet sich anhand der Farbintensität der grünen Felder, wobei Probe 14 mit 113.465 bce/cm² (dunkelgrünes Feld) am meisten bakterielle DNA und Probe 20 mit 2 bce/cm² (hellgrünes Feld) am wenigsten bakterielle DNA enthielt. Gelbe Felder und das + Zeichen zeigen Biofilm-positive Proben von dem vorangegangenen Projekt im Jahr 2020 (Lourenco et al. (2023)) an. Das - Zeichen steht für Biofilm-negative Proben und n.b. bedeutet „nicht beprobt“. 31

Danksagung

Im Rahmen meiner Abschlussarbeit möchte ich mich bei verschiedenen Personen bedanken, die mich während meiner akademischen Laufbahn unterstützt und inspiriert haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinen Betreuerinnen Viktoria Neubauer und Eva Maria Voglauer bedanken, die mich mit wertvollen Ratschlägen und konstruktivem Feedback unterstützt haben. Ich schätze die Zeit und Geduld, die beide in meine Arbeit investiert haben, sehr.

Mein Dank gilt auch meinen Familienmitgliedern und Freunden, die mich in jeder Phase meines Studiums ermutigt und unterstützt haben. Ohne ihre moralische Unterstützung und ihr Verständnis wäre es mir nicht möglich gewesen diesen Meilenstein in meiner akademischen Karriere zu erreichen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kommilitonen/Kommilitoninnen und Kollegen/Kolleginnen bedanken, mit denen ich in den letzten Jahren zusammenarbeiten und lernen durfte. Durch den Austausch von Ideen und Erfahrungen konnte ich mich persönlich und fachlich weiterentwickeln.

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die direkt oder indirekt dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit erfolgreich abschließen konnte.