

Biofilm på ståloverflader i fødevareproduktionen

Lisbeth Truelstrup Hansen

Professor

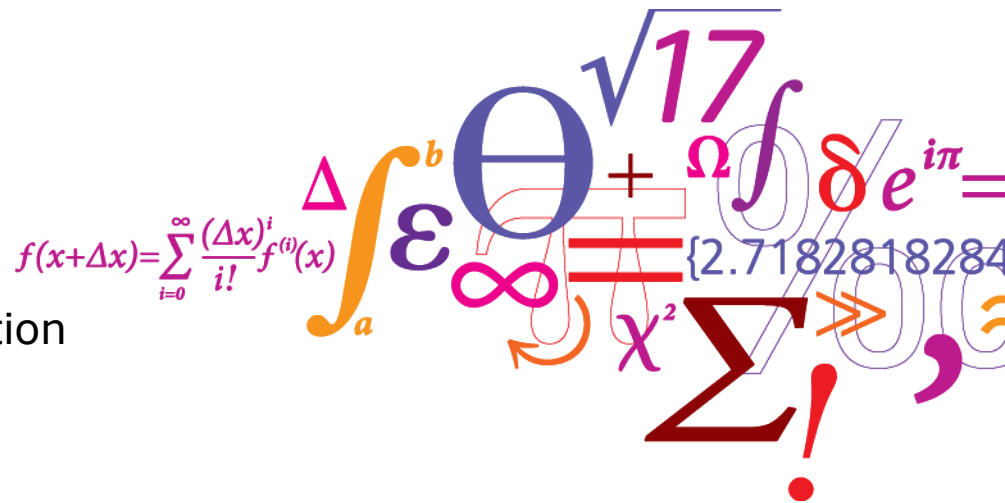
Afdeling for mikrobiologi og produktion

Mørkhøj Bygade 19, 2860 Søborg

Mail: litr@food.dtu.dk

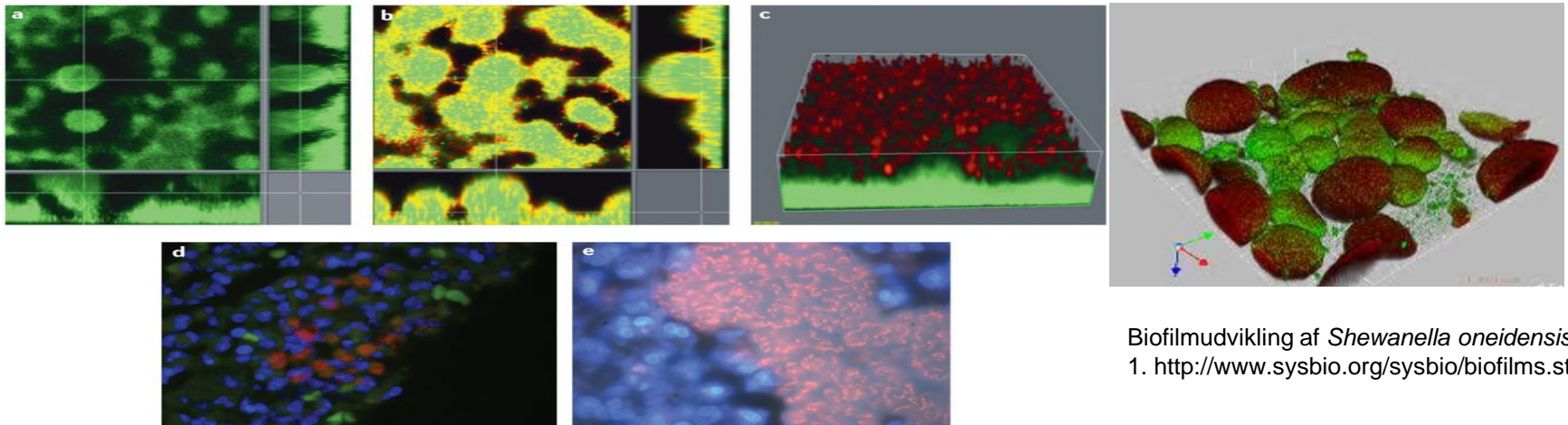
Tel: 3588 6278

DTU Fødevareinstituttet



Biofilm og fødevarsikkerhed

- Hvad er en biofilm?
- Hvordan dannes den?
- Hvordan ser den ud?
- Hvorfor er biofilm et problem i fødevarereproduktionen?
- Human patogenet *Listeria monocytogenes* og biofilm
- Biofilm og overlevelse af *Listeria* i produktionsmiljøet



Biofilmudvikling af *Shewanella oneidensis* MR-1. <http://www.sysbio.org/sysbio/biofilms.stm>

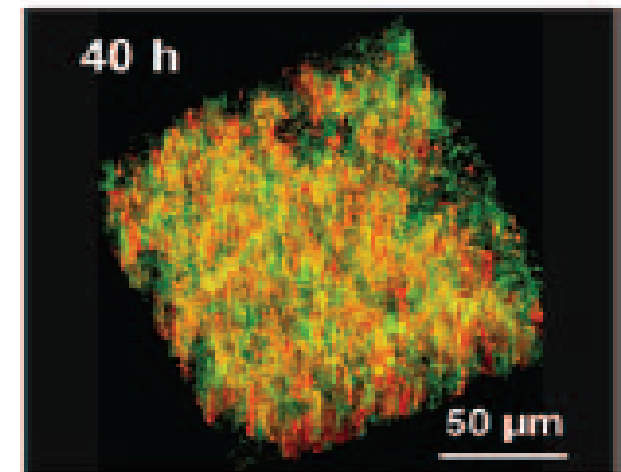
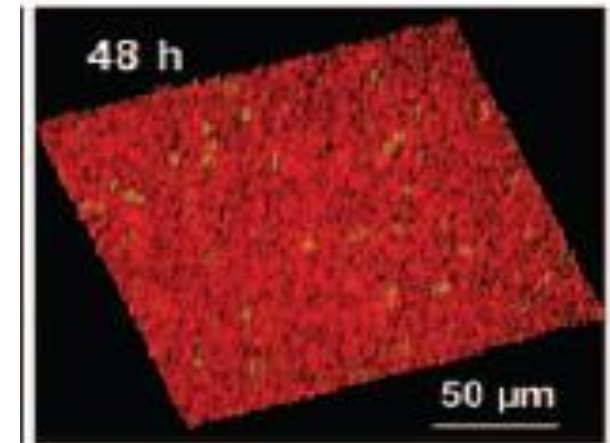
Hvad er en biofilm?

- Samling af overflade associerede mikroorganismer, der er dækket af et ekstracellulært polymerisk substans (EPS) lag
 - Sidder fast og kan ikke fjernes ved let skylning
 - EPS lag (slim) bestående af polysakkarider, protein og/eller ekstracellulært DNA (eDNA)
- Biofilm findes overalt:
 - Levende væv, sår, tænder
 - Medicinske implantater
 - Rørledninger – industrielle og drikkevand
 - Overflader i fødevarerindustrien
 - Skibsskrog
 - Naturlige vandmiljø



2 slags biofilm: statisk & dynamisk

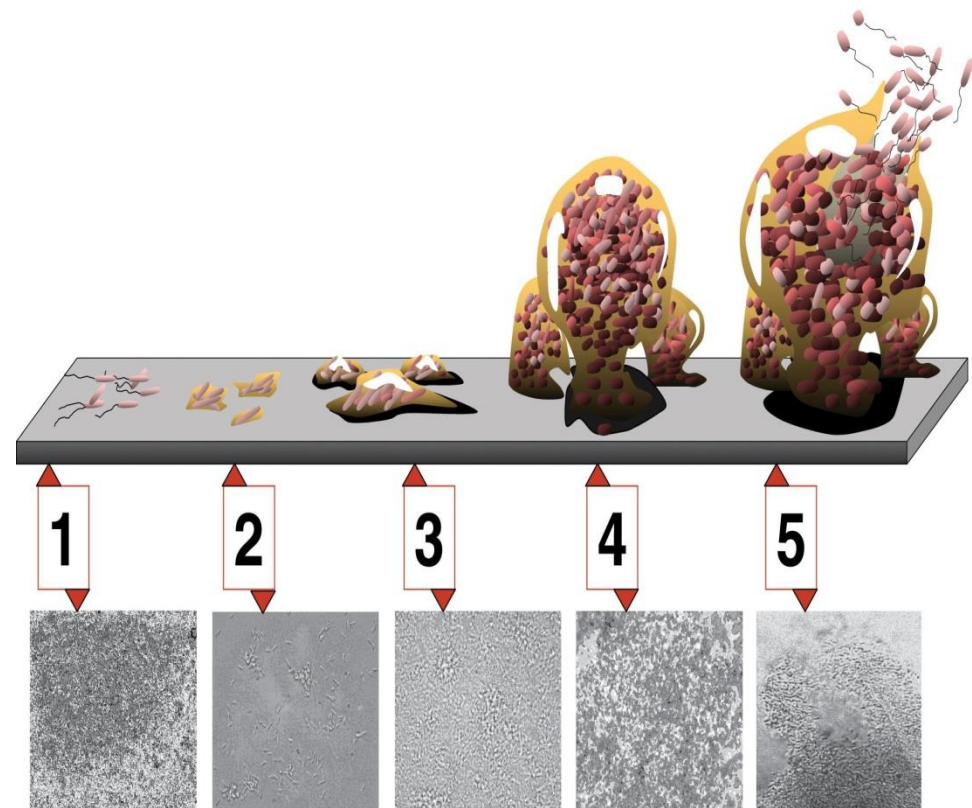
- Statisk (stillestående vand)
 - Findes på overflader (vand/luft)
 - Etableres ved transport af bakterier til overflader
 - Afhænger af overfladetype, næringstoffer, fugtighed, tid \times temperatur
 - Ses i fødevareindustrien, hospitaler, toiletter, osv.
- Dynamiske (flydende vand)
 - Findes på overflader, der er omgivet af vand
 - Afhænger af hydrodynamiske forhold, osv.
 - Ses i vandrør, på skibes skrog, rør i mejeriindustrien, osv.



L. monocytogenes statisk (top) og dynamisk (bund) biofilm. (Rieu et al. 2008)

Biofilm: vedhæftning

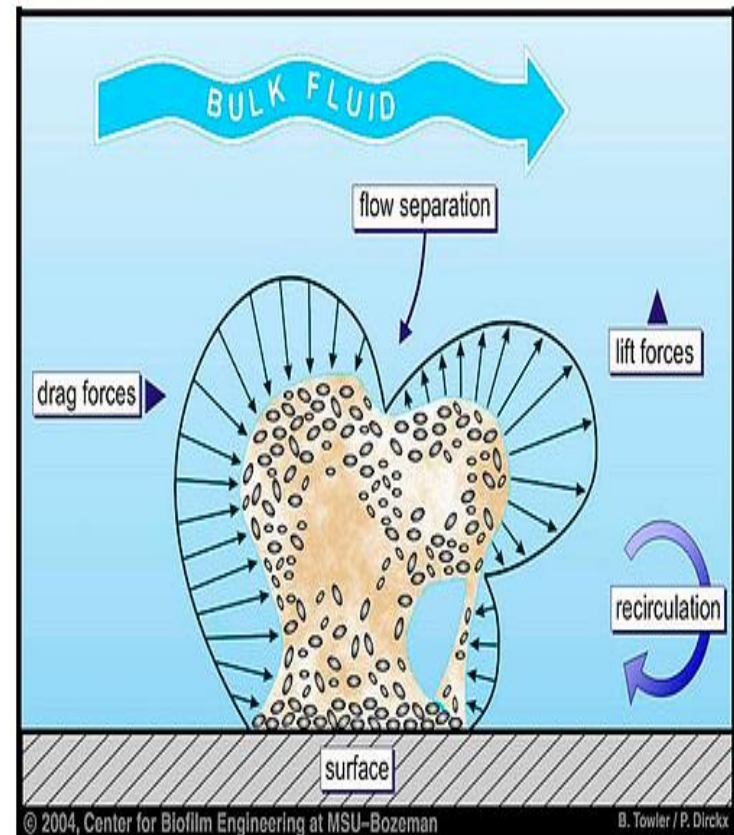
- Effekt af overfladematerialet
 - Ruhed
 - Elektrisk ladning
 - Vandafvisende
- Tilsmudsning
 - Lag med polymerer fra (proces)vand og/eller snavs og madrester



Monroe D. 2007. "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms" PLoS Biology Vol. 5, No. 11, doi:10.1371/journal.pbio.0050307

Biofilm: hydrodynamik

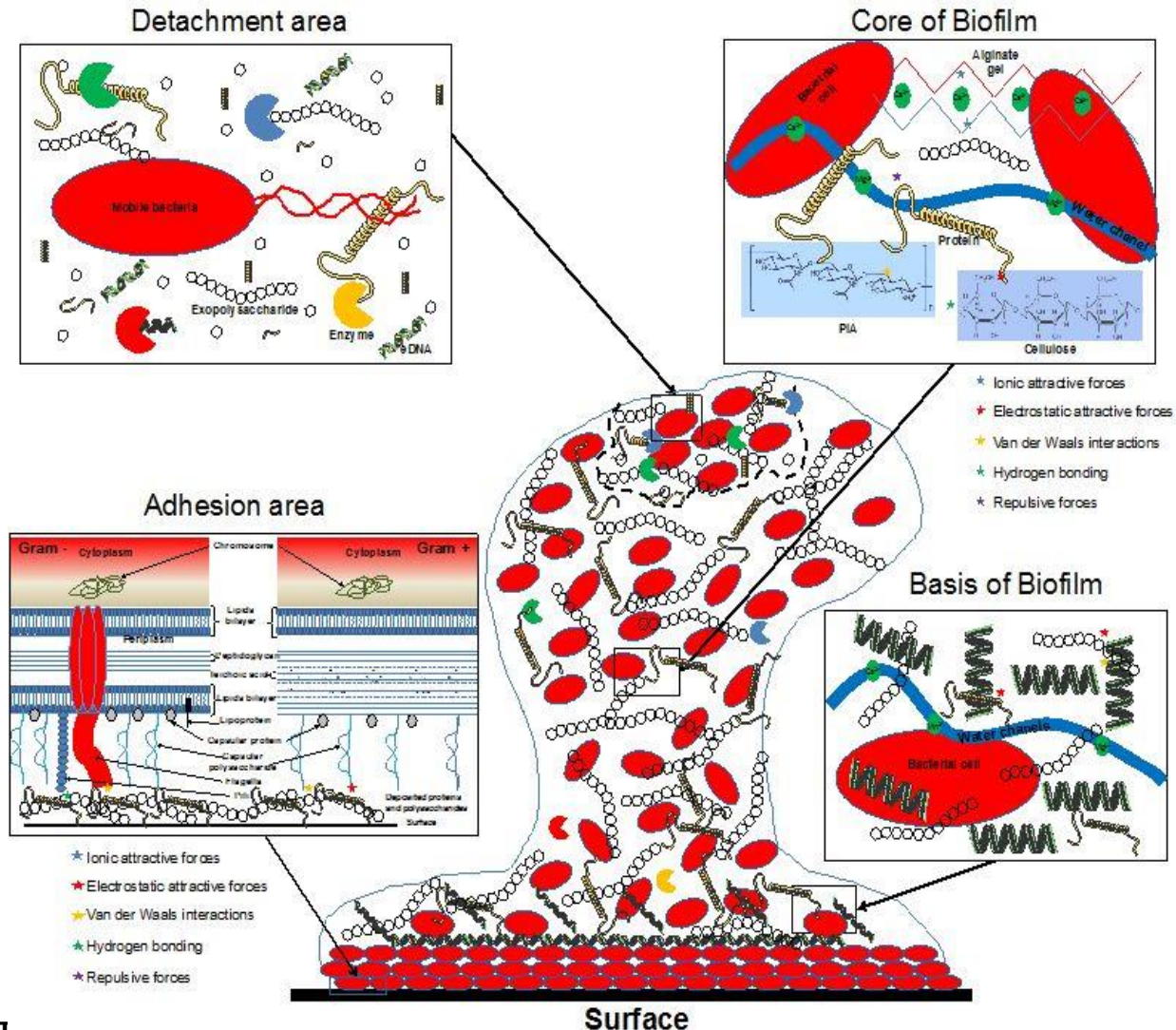
- I dynamiske biofilm
 - Tykkelse af det hydrodynamiske grænselag (→ laminært eller turbulent vandstrøm)
 - Høj strømningshastighed kan skabe kræfter, der "sliber" biofilmen ned
 - Lav strømningshastighed giver modsat ingen kræfter, der kan nedbryde biofilmen
- Hvor tror I, at man finder langsomme og hurtige strømningshastigheder i rørledningerne på en virksomhed?



Biofilm: vedhæftning

- Vandfase/snavs
 - pH og temperatur
 - Næringsstoffer
 - Ionstyrke

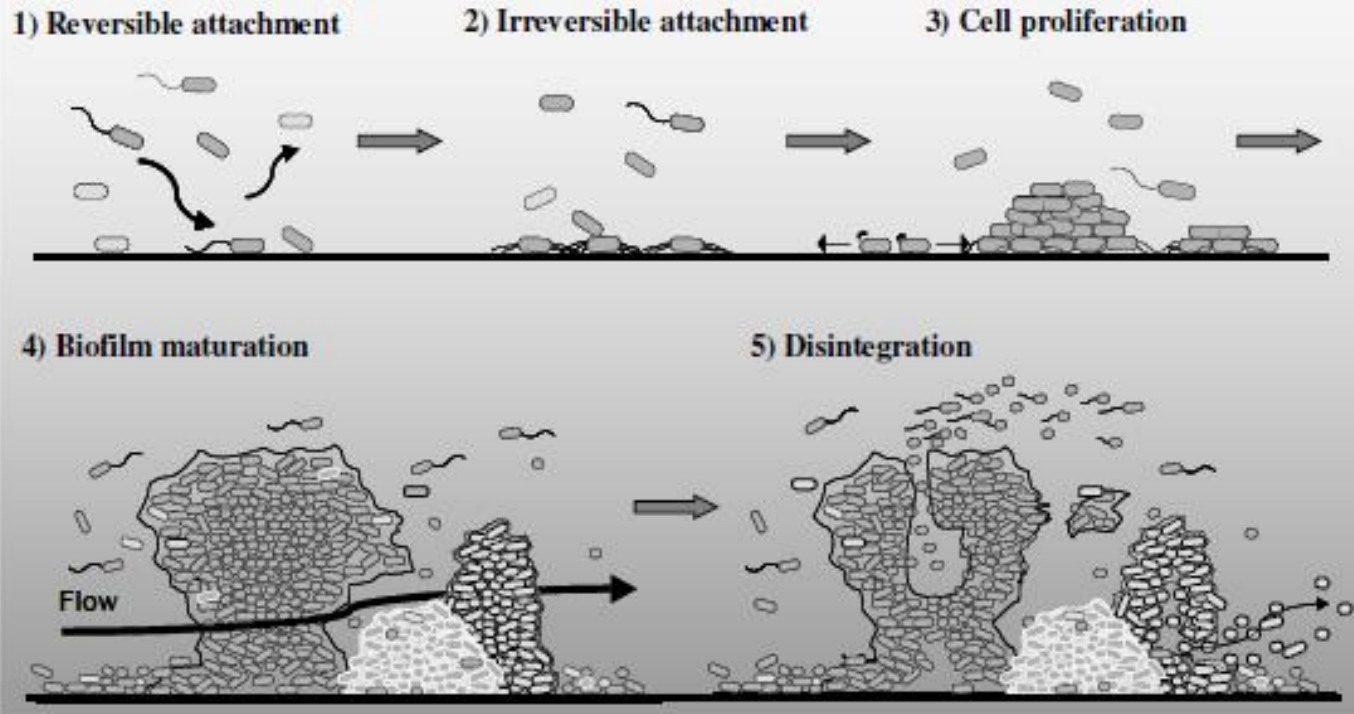
- Celleoverfladen
 - Hydro- eller hydrofobicitet
 - Fimbrier og flageller (bevægelse)
 - Produktion af EPS, enzymer og genregulering



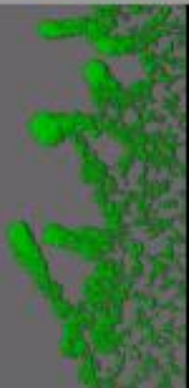
Dannelse af dynamiske biofilm

In hydrodynamic conditions biofilm development depends on *adhesive forces*.

At the substratum bacterial motility may have significant impacts on structure development

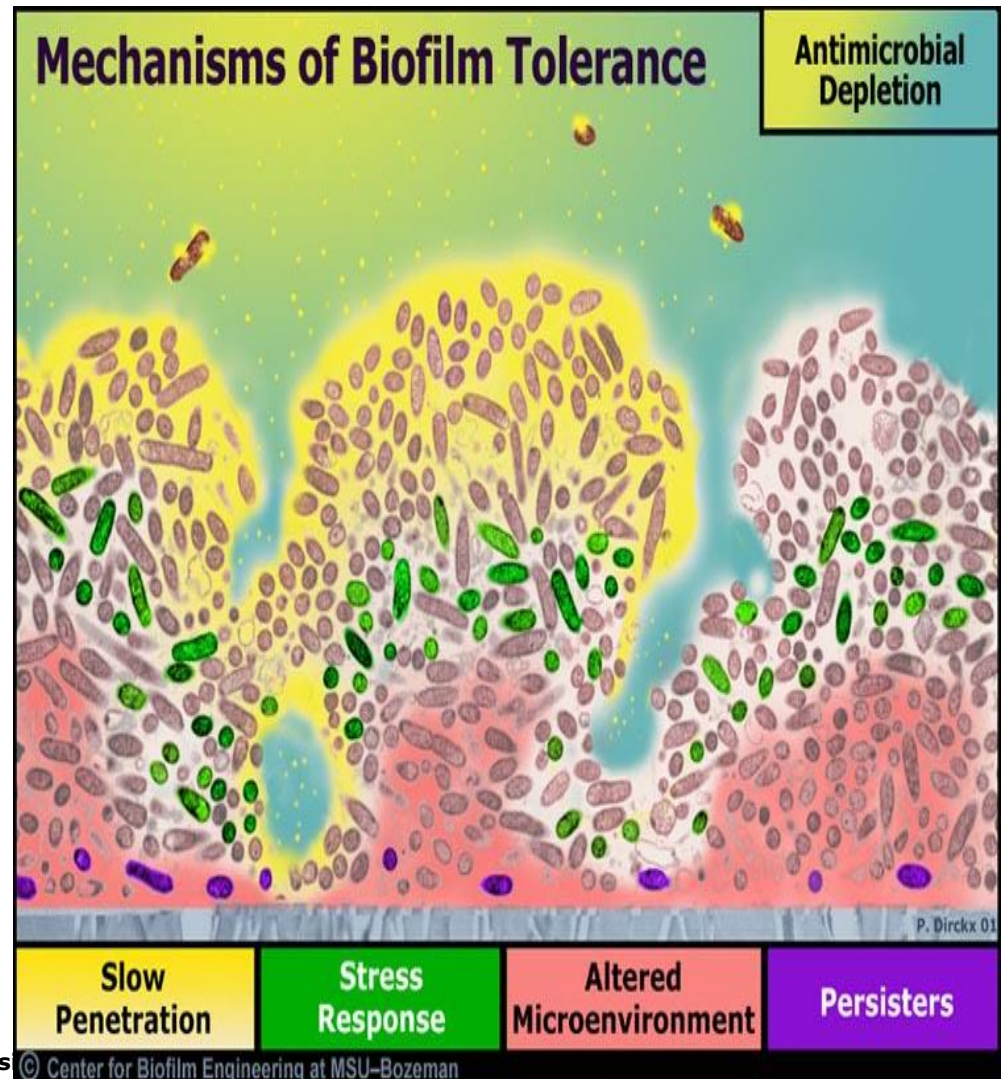


- **Colonizers** – able to attach to surface
- **Stickers** – able to form micro-colonies
- **Twitchers** – able to migrate on surface
- **Swimmers** – able to move in water column
- **Swarmers** – able to spread on conditioned surface



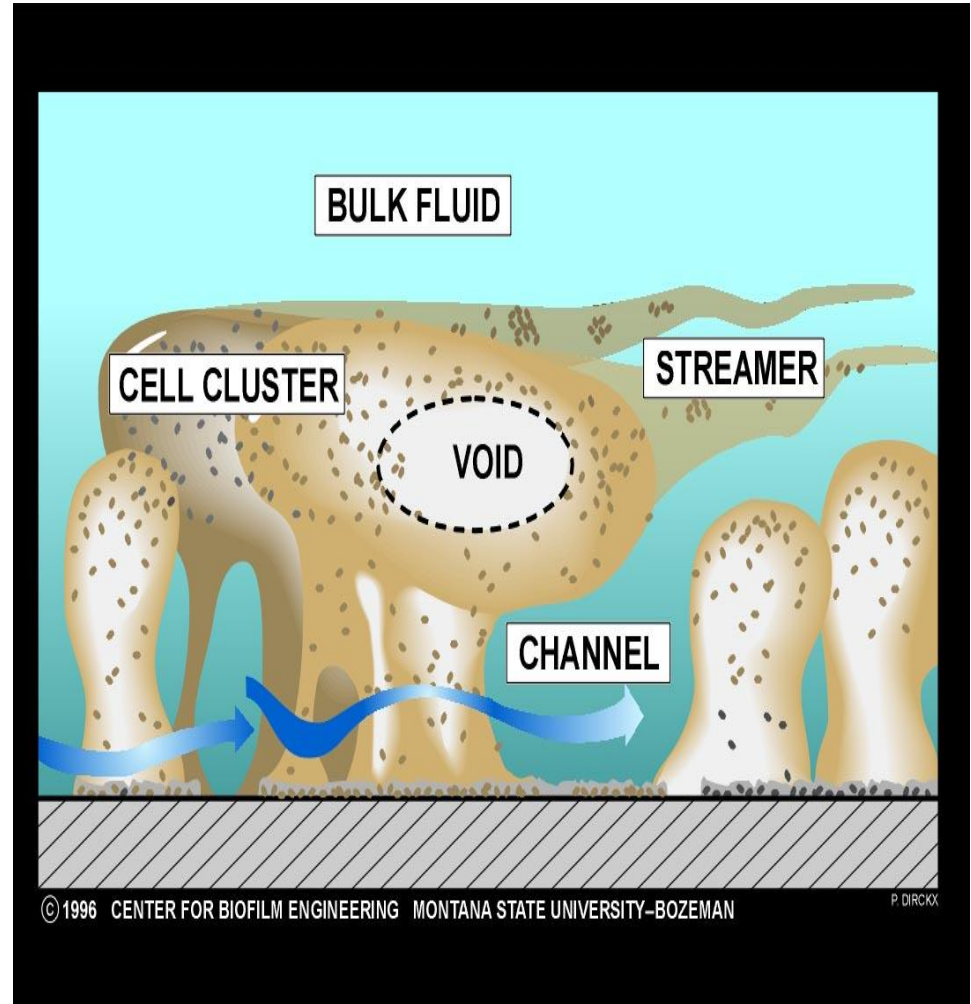
EPS: Biofilm “Slim”

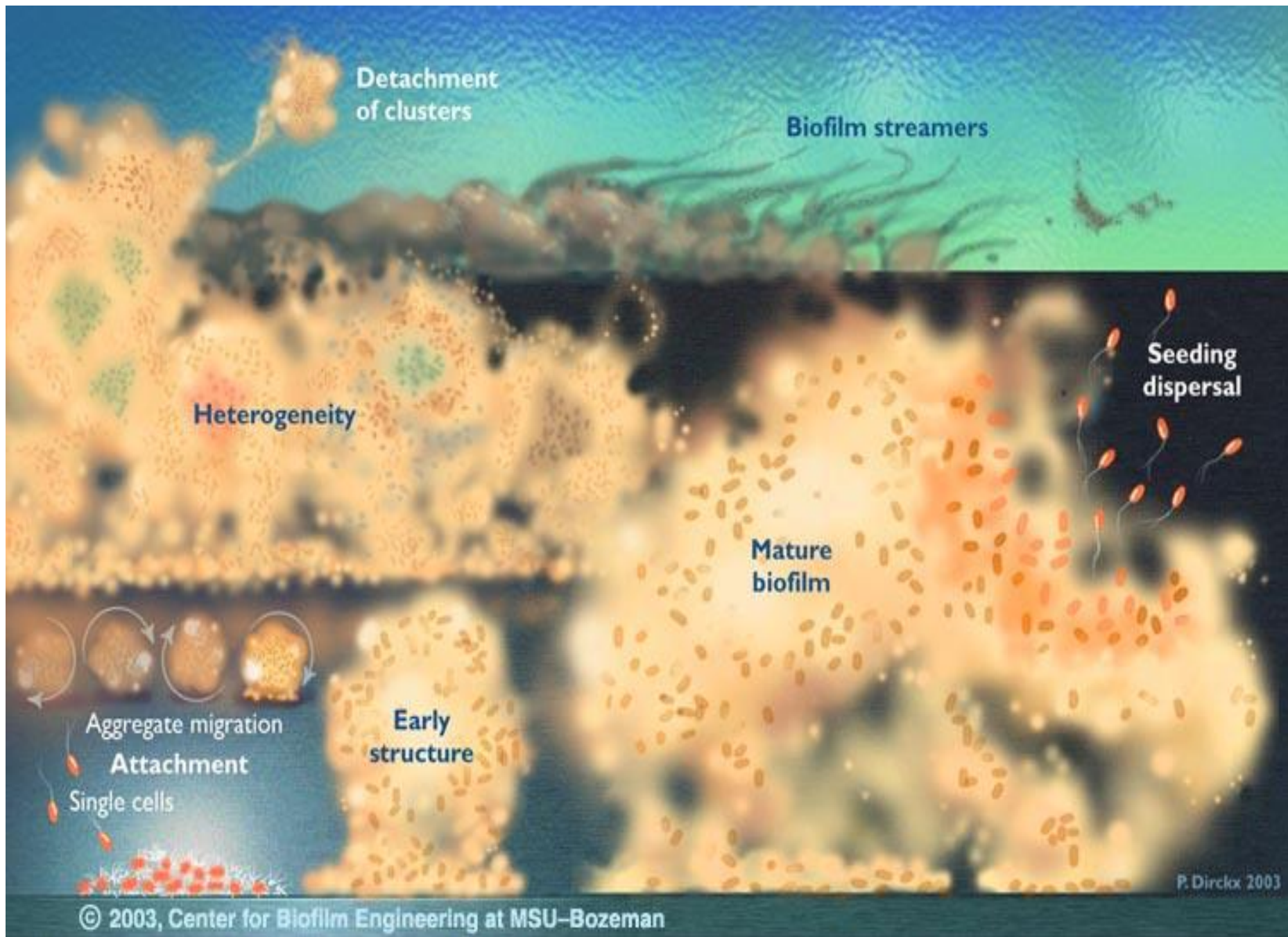
- Ekstracellulær polymerisk substans (EPS)
 - Står for 50-90% af alt organisk kulstof i biofilm
 - EPS er lavet af polysakkarider, proteiner og/eller eDNA
 - Meget vandholdigt (modvirker udtørring)
 - Binder fedt, andre proteiner, osv.
 - Nedsætter effekten af desinfektionsmidler og antibiotika



Biofilm struktur

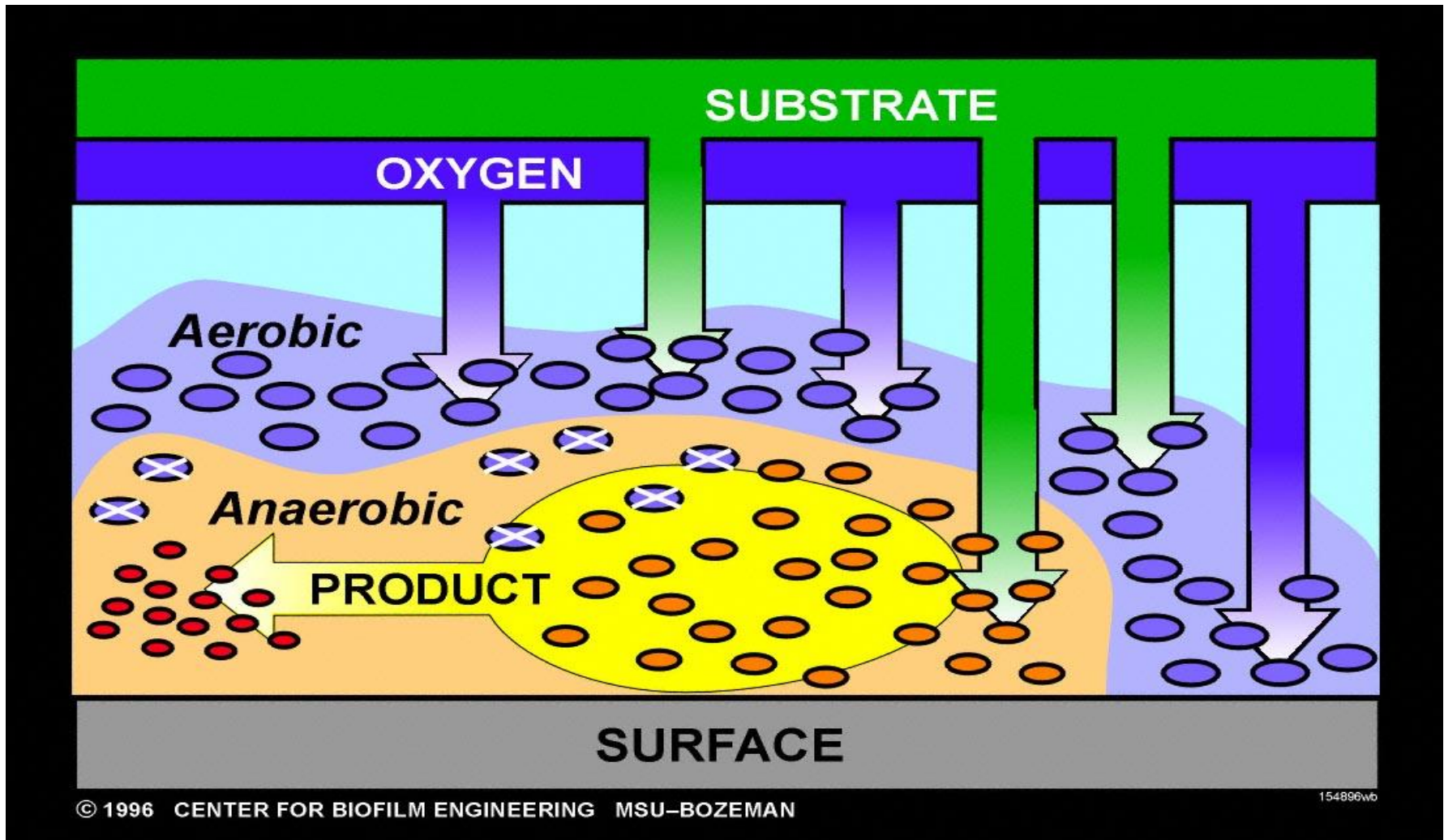
- Heterogen med små adskilte mikrokolonier indkapslet i EPS
- I dynamiske biofilm er der vandkanaler mellem de små kolonier. Kanalerne tillader diffusion af næringsstoffer, ilt og antimikrobielle stoffer
- Biofilmlaget er normalt mellem 15-40 μm tykt





P. Dirckx 2003

Diffusion af ilt og næringsstoffer

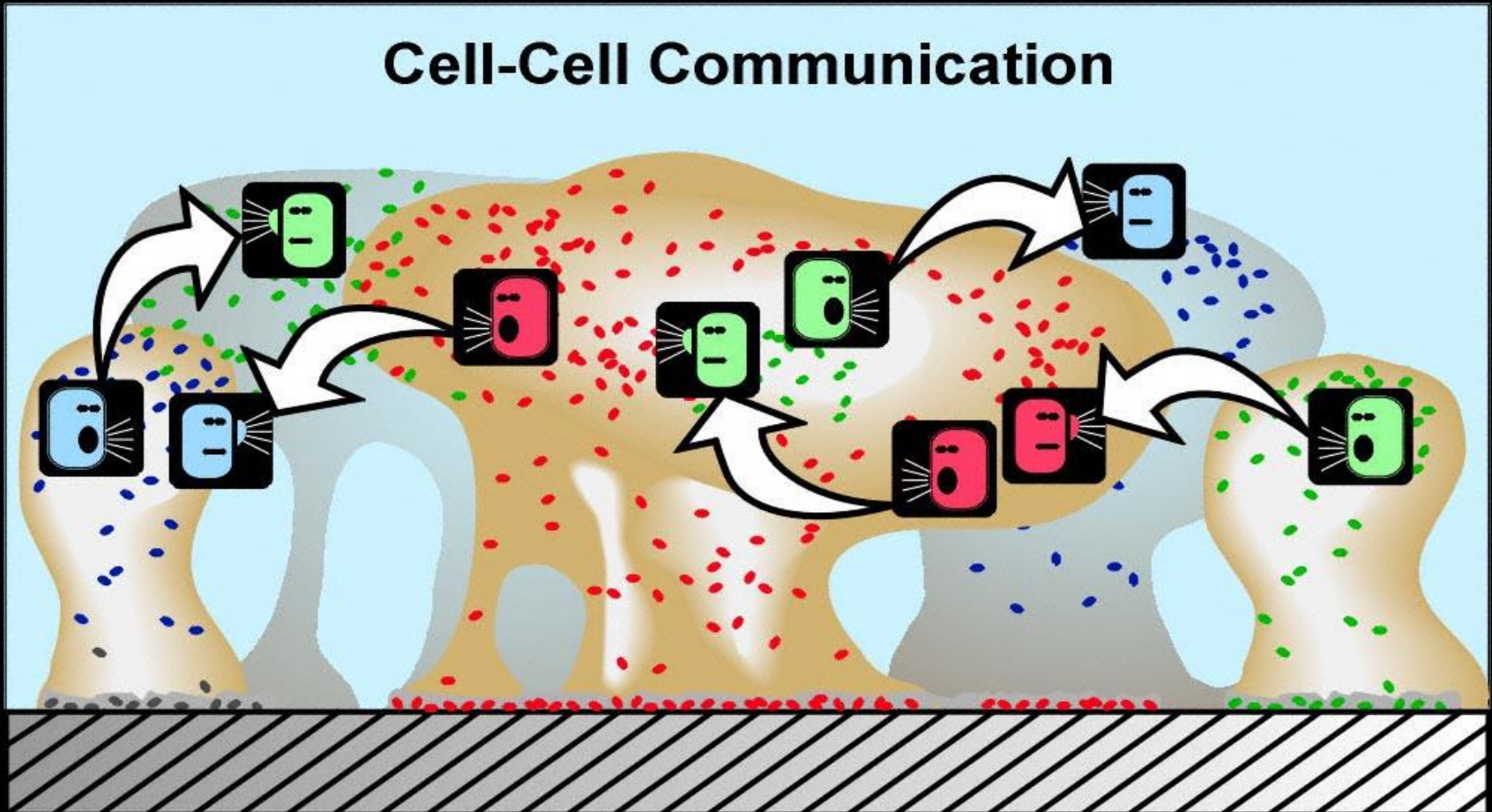


Biofilm økologi

- Den strukturelle enhed, mikrokolonien, skaber et miljø med mulighed for udveksling af gener og “quorum sensing”
- Geneudveksling
 - Plasmid DNA med antibiotika resistensgener!
- Quorum sensing
 - Signal mellem celler, besked om vedhæftning eller frigørelse
 - Biofilmdannelse begynder først, når der er et “quorum”
- Konkurrence
 - Fritlevende protozoer (protister), bakteriofager, og parasitbakterier (*Bdellovibrio* spp.) spiser af biofilmen
 - Forskellige bakteriearter konkurrerer om plads og næringsstoffer. De bor i separate mikrokolonier

Quorum Sensing: kommunikation

Cell-Cell Communication

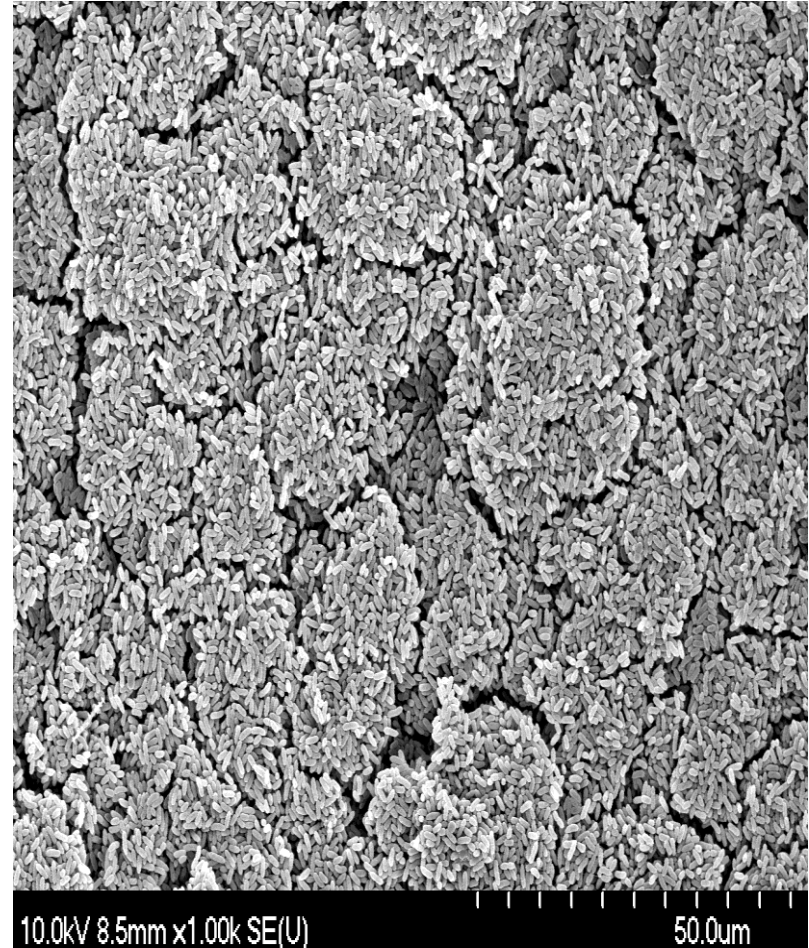


© 1997 CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING MSU-BOZEMAN

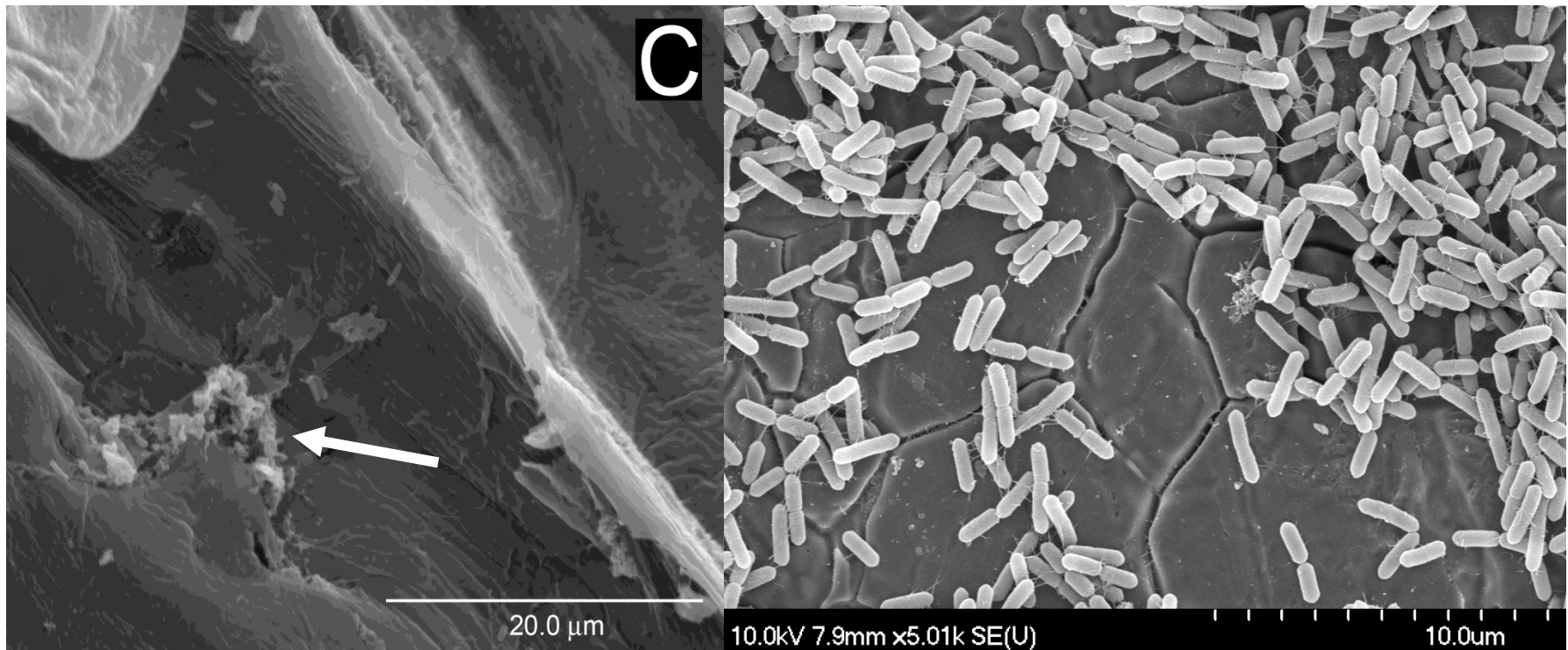
201497cs

Biofilm & krydsforurening

- Patogener i biofilm
 - *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio cholerae* og *Helicobacter pylori*
 - Overlevelse og vækst afhænger af konkurrence i biofilmen, der ofte består af mange bakterielle arter
- Fordærvelsesbakterier
- Risiko for overførelse når fødevarerne kommer i kontakt med overflader, der er smurt ind i biofilm!



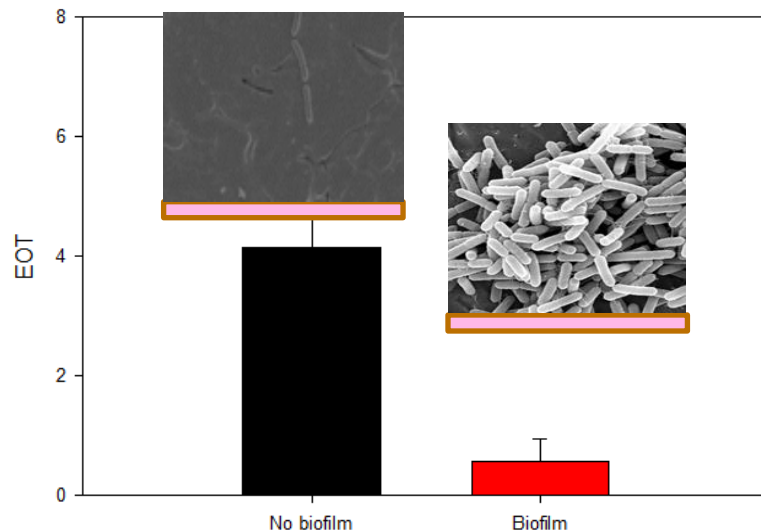
L.monocytogenes biofilm



- *L. monocytogenes* biofilm på hvidkål (24 timer ved 10°C, Ells and Truelstrup Hansen, 2006) eller rustfrit stål (48 timer ved 15°C, Daneshvar Alavi & Truelstrup Hansen, 2013)

Overførsel fra biofilm

- *L. monocytogenes* i biofilm overlever i et større antal men overføres i mindre grad til fødevarer, der berører den forurenede overflade.
- Men sammenholdes stigningen i overlevelse, fører biofilmdannelse til en mere persisterende overførsel af *L. monocytogenes*



Figur. Effektivitet af transfer (EOT) af *L. monocytogenes* uden og med biofilmdannelse (Truelstrup Hansen and Vogel, 2011)

Biofilm og rengøring

- Trin i rengøring
 - Forberede rengøring – fjerne madrester
 - Gøre rent ved hjælp af fysiske kræfter (højttryksspuling, fejning, osv.) og kemi
 - Desinfektion – reducere/eliminere tilbageblevne mikroorganismer



Sinners cirkel



Fjernelse af biofilm

- **Fysiske teknikker:**
 - Højtryksspuling, strømningshastighed (slibning, wall shear forces)
- **Oxiderende reagerer, fx.,**
 - Chloriner: ClO_2 men ikke HClO
 - Pereddikesyre (peracetic acid, dvs. blanding af peroxyacetic acid, hydrogen peroxide og acetic acid)
- **Andre teknikker:**
 - Basiske rengøringsmidler (chlorinerede)
 - Ultralydsinstrumenter (evt. i kombination med chelators [EDTA] og enzymer)
 - Enzym baserede rengøringsmidler (til nedbrydelse af EPS)
 - Naturlige antimikrobielle stoffer (essentielle olier mm.)

Hygiejnisk design af udstyr

Hvad?

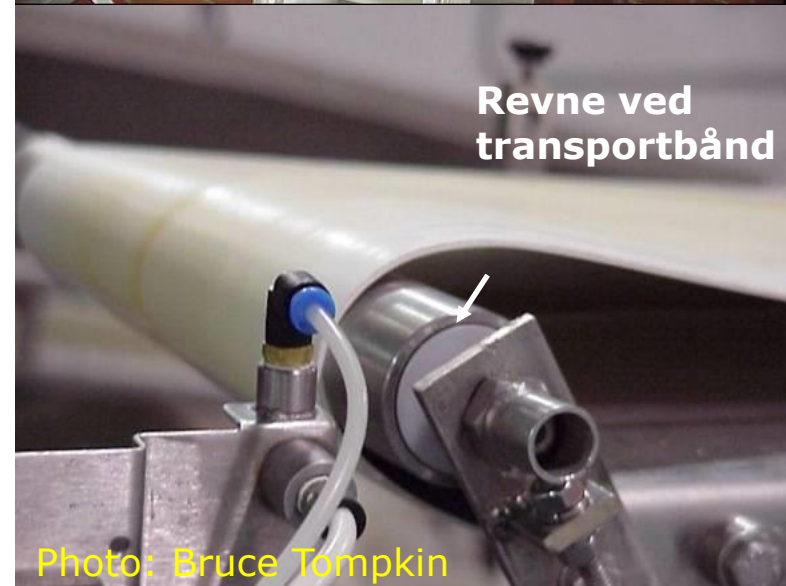
Rengøring og desinfektion skal tage højde for steder, hvor det kan være svært at fjerne og inaktivere *L. monocytogenes*

Hvor?

Sortering, opskæring, transportbånd, dræn og gulve, osv.

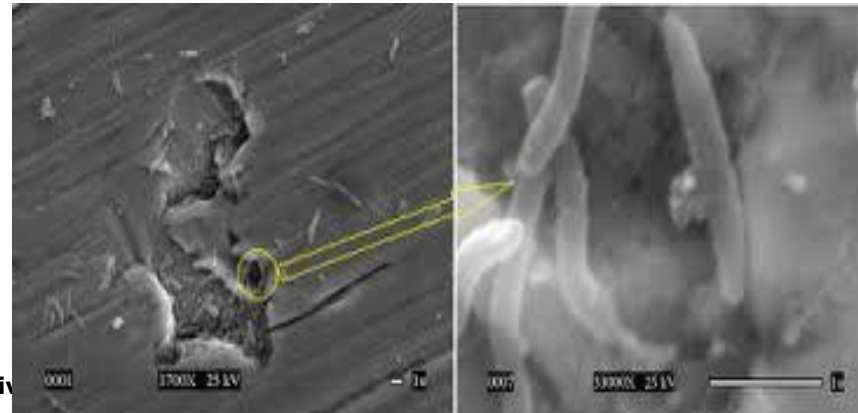
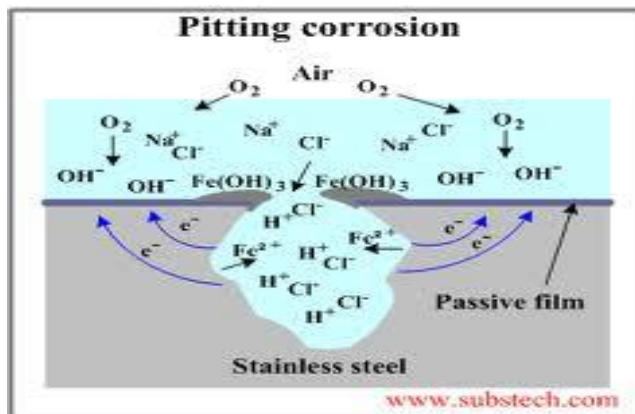
Hvorfor?

- Mangel på rengøring og desinfektion
- Dårligt hygiejnisk design
- Vedhæftede bakterier/biofilm



Hvad er aktivt og passivt rustfrit stål?

- **Passivt** rustfrit stål er dækket af et beskyttende Cr_2O_3 lag, således at det ikke reagerer med madrester, biofilm, osv.
- **Aktivt** rustfrit stål har mistet det beskyttende Cr_2O_3 lag, således at det ruster, bliver magnetisk, binder sig til madrester, biofilm, osv.
- Vedligeholdelse af det passive rustfrie stål ved behandling med:
 - 1) HNO_3 , saltpetersyre (*hurtigst*)
 - 2) H_2O_2 (brintoverilte) (*hurtigt*)
 - 3) citronsyre (*mellem*)
 - 4) luft (*langsomt*)

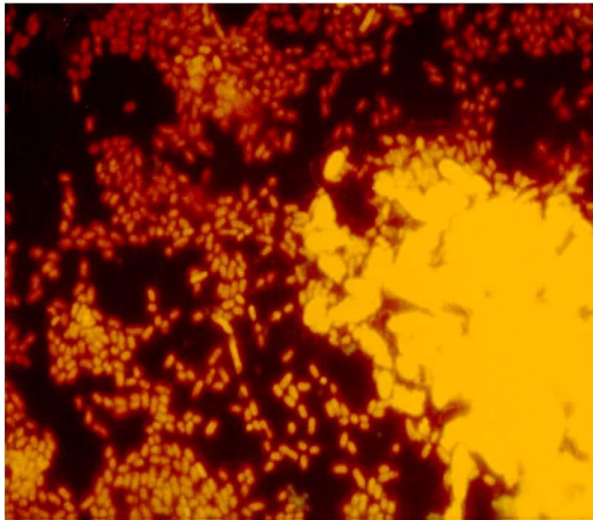


Biofilm og effekt af desinfektionsmidler

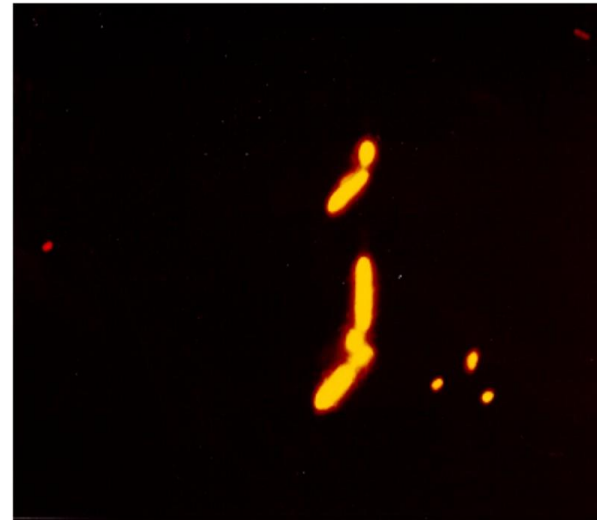
Tabel. Koncentration af benzalkonium chloride ($\mu\text{g}/\text{mL}$) til at forhindre planktonisk vækst (MIC), biofilmdannelse (MBIC) efter 48 timer eller 6 dage, eller fjernelse af etableret biofilm (MBEC). (Piercey, 2015, Ph.d. afhandling)

Stamme	Kilde	MIC 48 t	MBIC 48 t	MBIC 6 d	MBEC 6 d
08-7376	Kød	10	5	10	>80
08-5578	Patient	5.0	5	10	80
NB1	Røget laks	10	10	10	80
06-6956	Patient	2.5	1.25	10	80
568	Mejeri	2.5	1.25	5	80
CP 5 2-3	Vandløb	1.25	1.25	5	80
CP4 5-1	Vandløb	1.25	1.25	5	80

Biofilm på rustfrit stål før og efter rengøring



a) Før



b) Efter

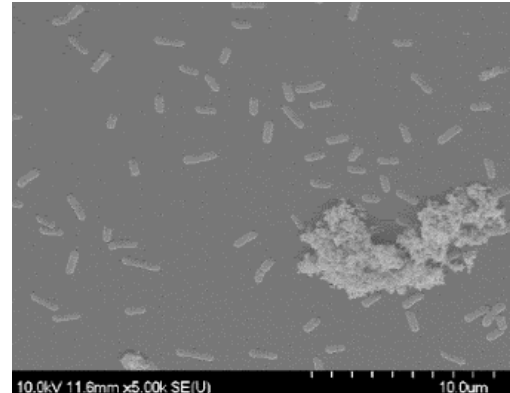
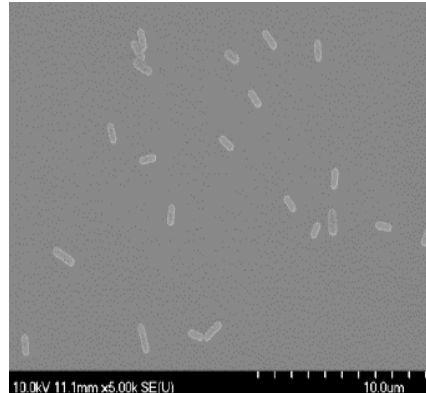
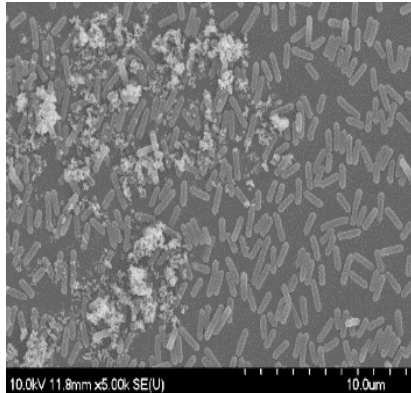
Overfladen i billede (b) er nu klar til at blive desinficeret!

Biofilm og antimikrobielle stoffer

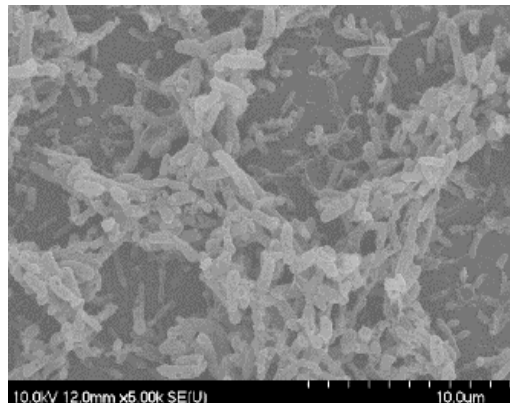
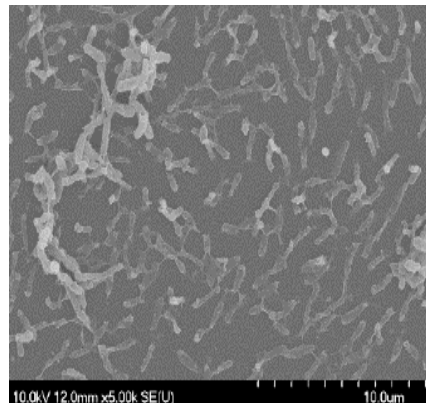
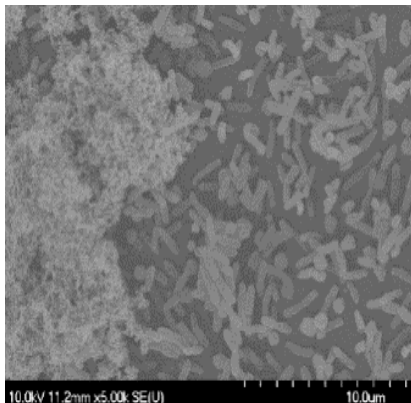
Kontrol

Carvacrol

Citrongræsolie



L. monocytogenes
568 + *Salmonella*
Typhimurium
MBEC



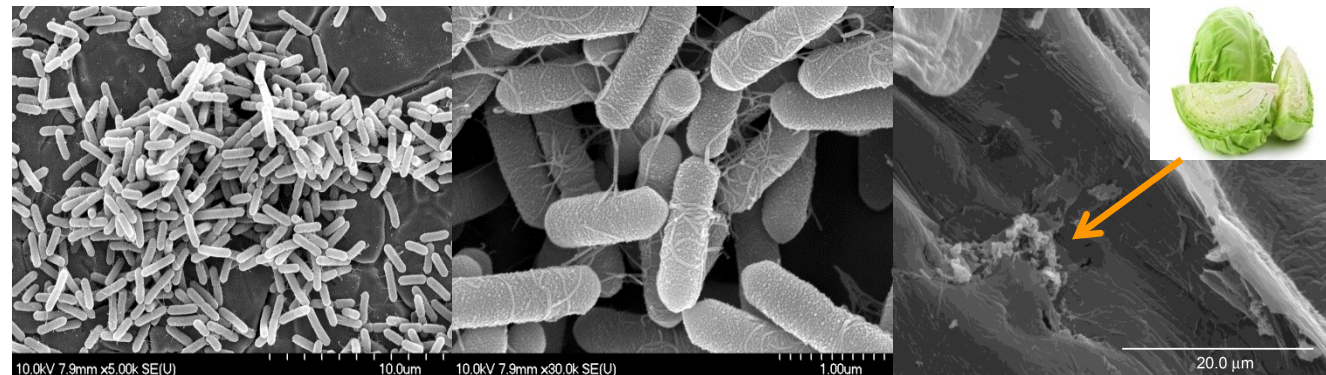
L. monocytogenes
568 + *Shewanella*
baltica MBEC

(D'Éntremont, 2015,
M.Sc. afhandling)

Beskytter biofilm under udtørring?

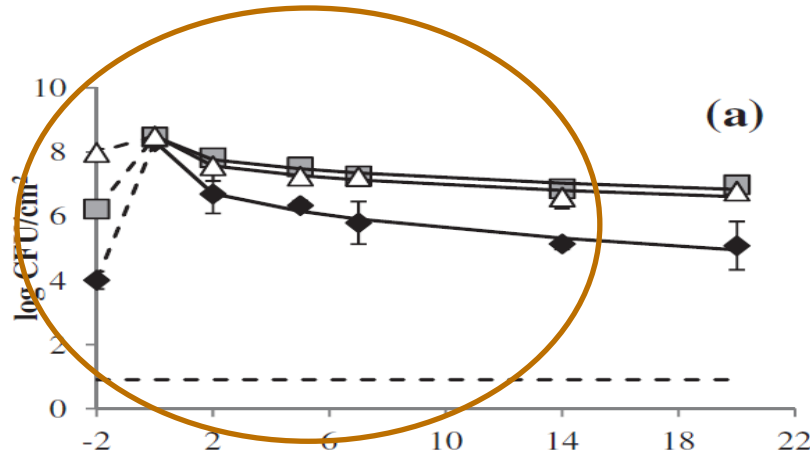
- Persisterende *Lm* stammer er gentagne gange blevet isoleret fra den samme produktionsvirksomhed igennem mere end 12 år
- *Lm* overlever udtørring i 3 måneder på overfladen af rustfrit stål i et simuleret fødevareproduktionsmiljø. Derfor kan tolerance til udtørring være en del af forklaringen på bakteriens persistens

(SEM billeder:
Hingston,
Daneshvar and Ells)

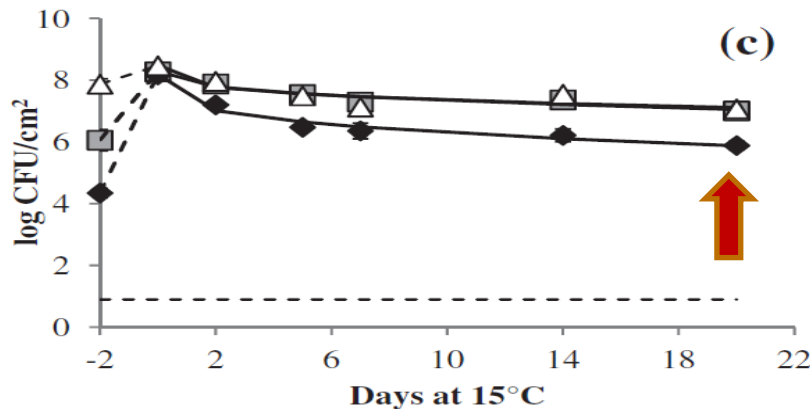


Biofilm modenhed og overlevelse under udtørring

Non-Osmoadapted



Osmoadapted



- Jo mere udviklet (moden) at biofilmen er jo mere beskytter den *Listeria* mod udtørring
- Den mindst udviklede biofilm beskyttede ikke *Listeria*
- Listeria* blev dog kun reduceret 100 gange

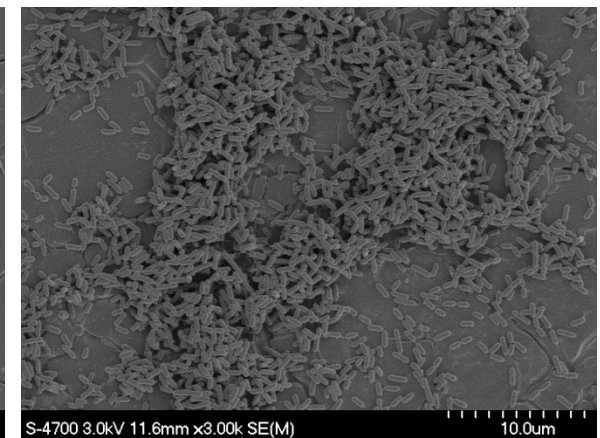
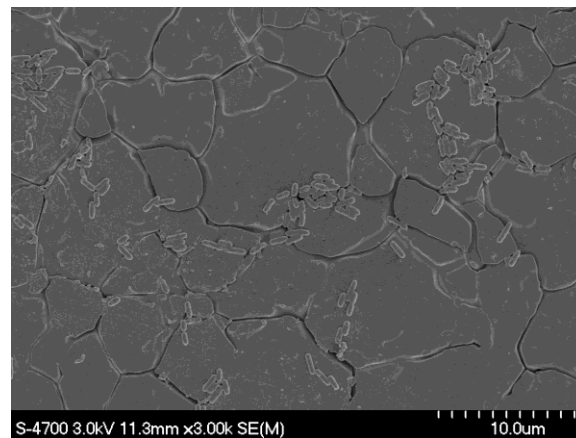
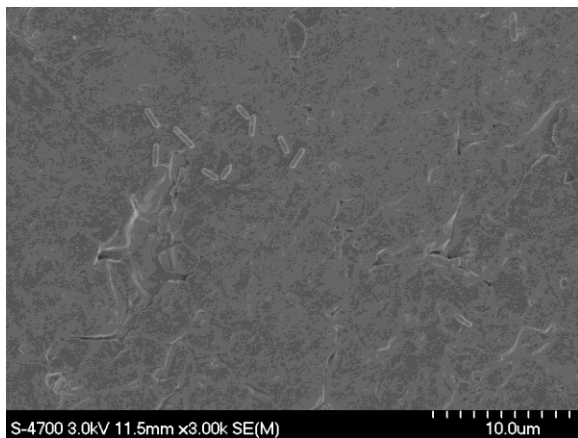
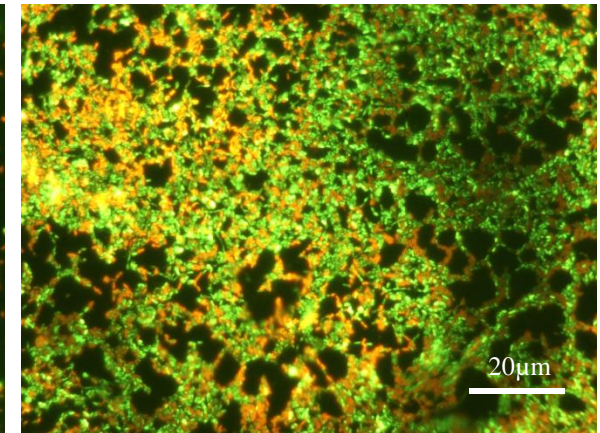
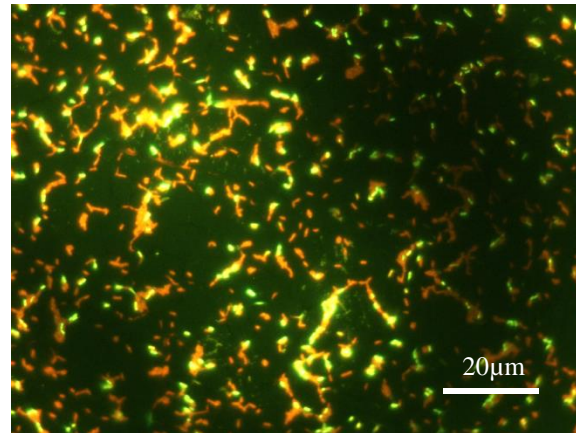
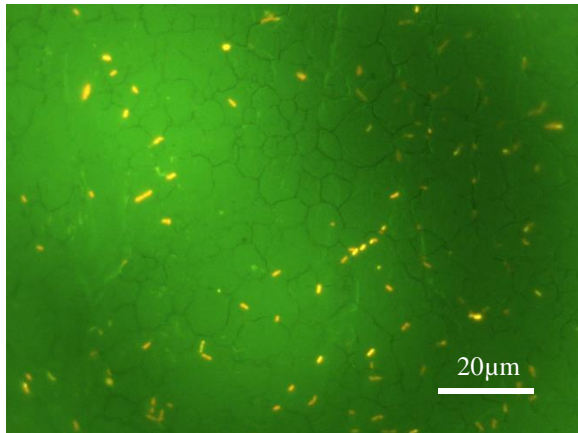
Overlevelse af biofilm *L. monocytogenes* under udtørring på rustfrit stål (43% RH over 21 dage, 15°C)

SEM og fluorescens mikroskopi af *L. monocytogenes* biofilm efter udtørring i 2 dage

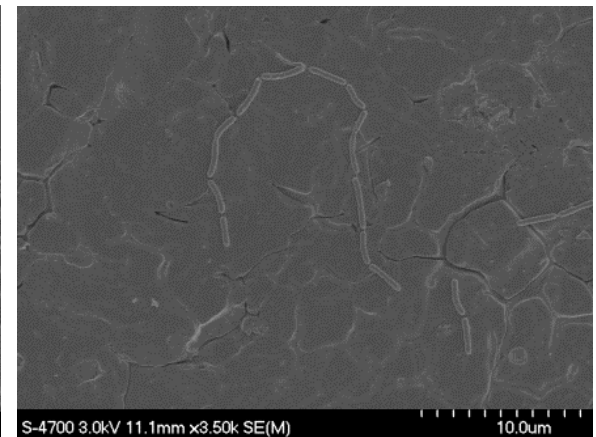
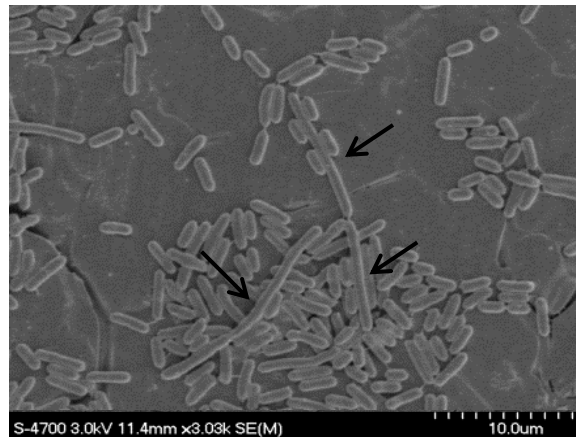
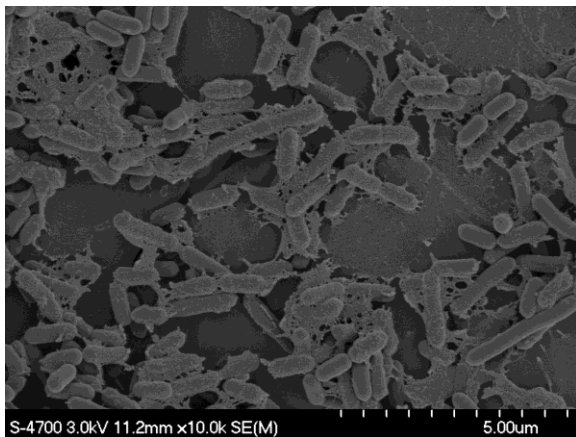
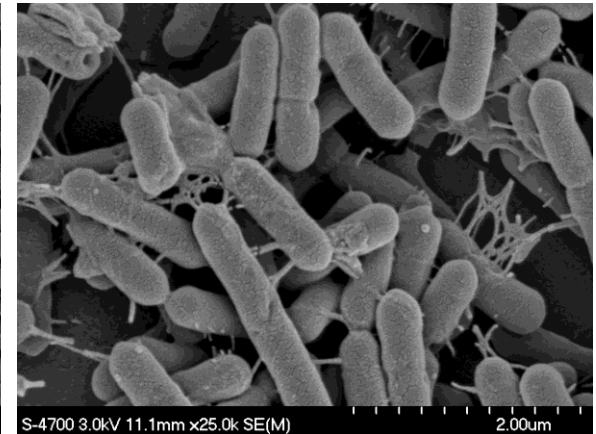
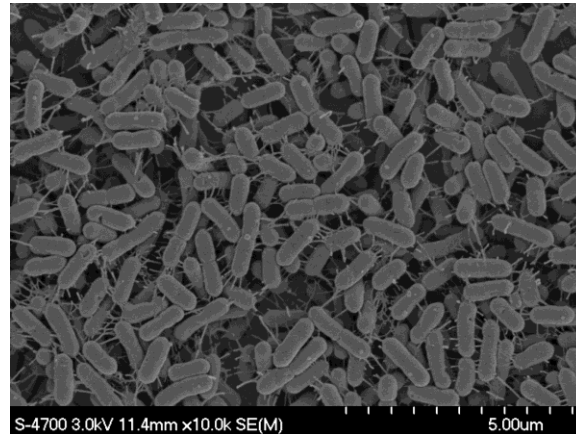
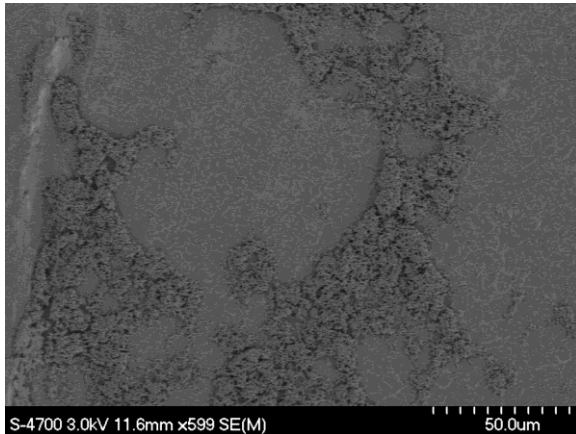
LAV

MELLEM

HØJ

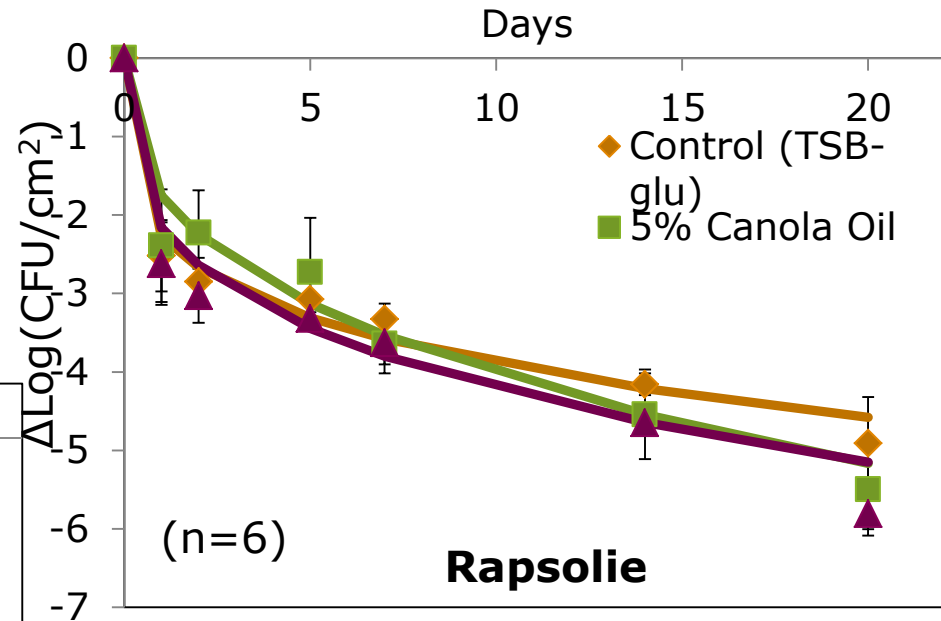
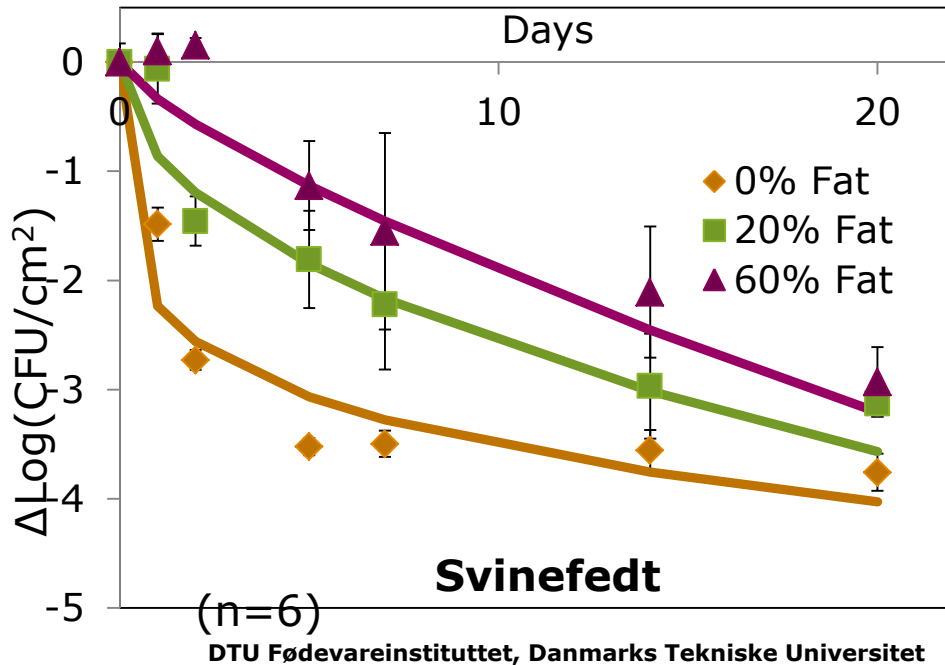


Detaljer af *L. monocytogenes* biofilm på rustfrit stål



Beskytter fedt fra fødevarer bakterier (her *L. monocytogenes*) under udtørring?

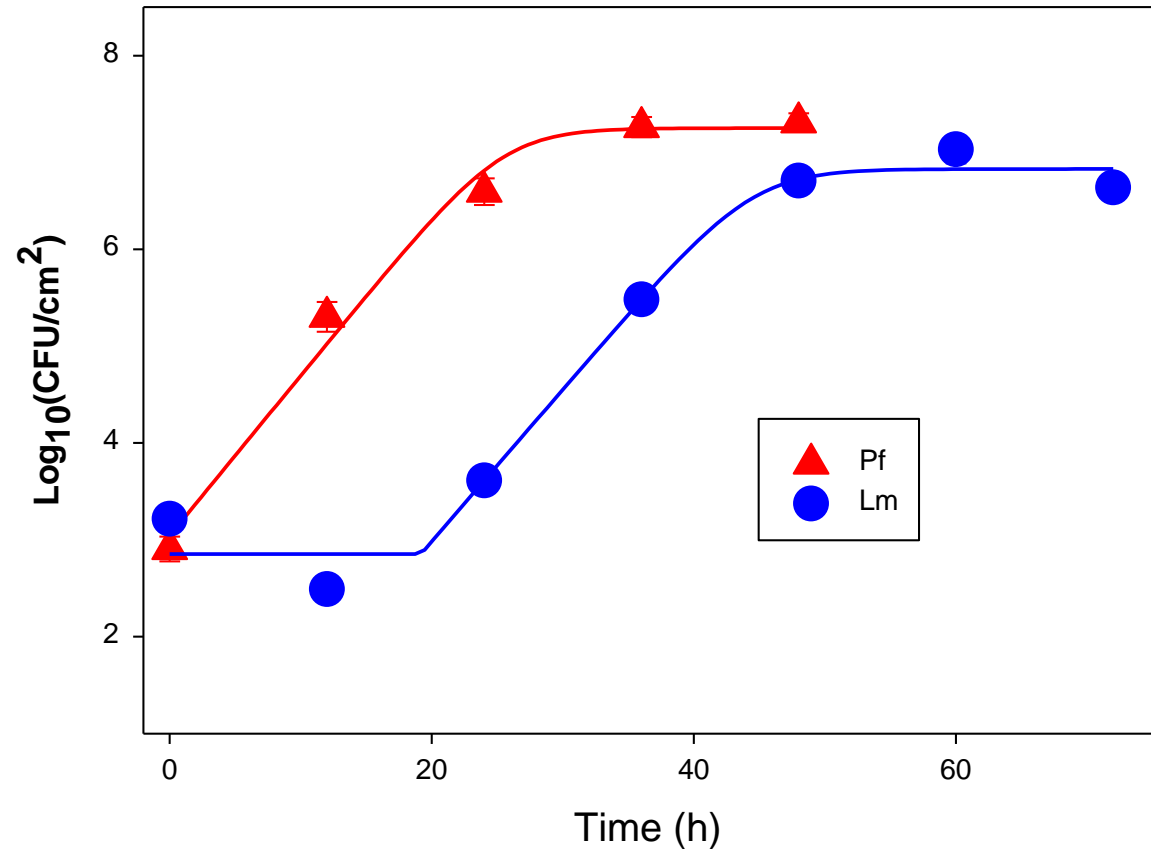
- 5-10% umættet fedt (rapsolie) havde ingen effekt
- $\geq 20\%$ mættet fedt (svinefedt) øgede overlevelsen signifikant

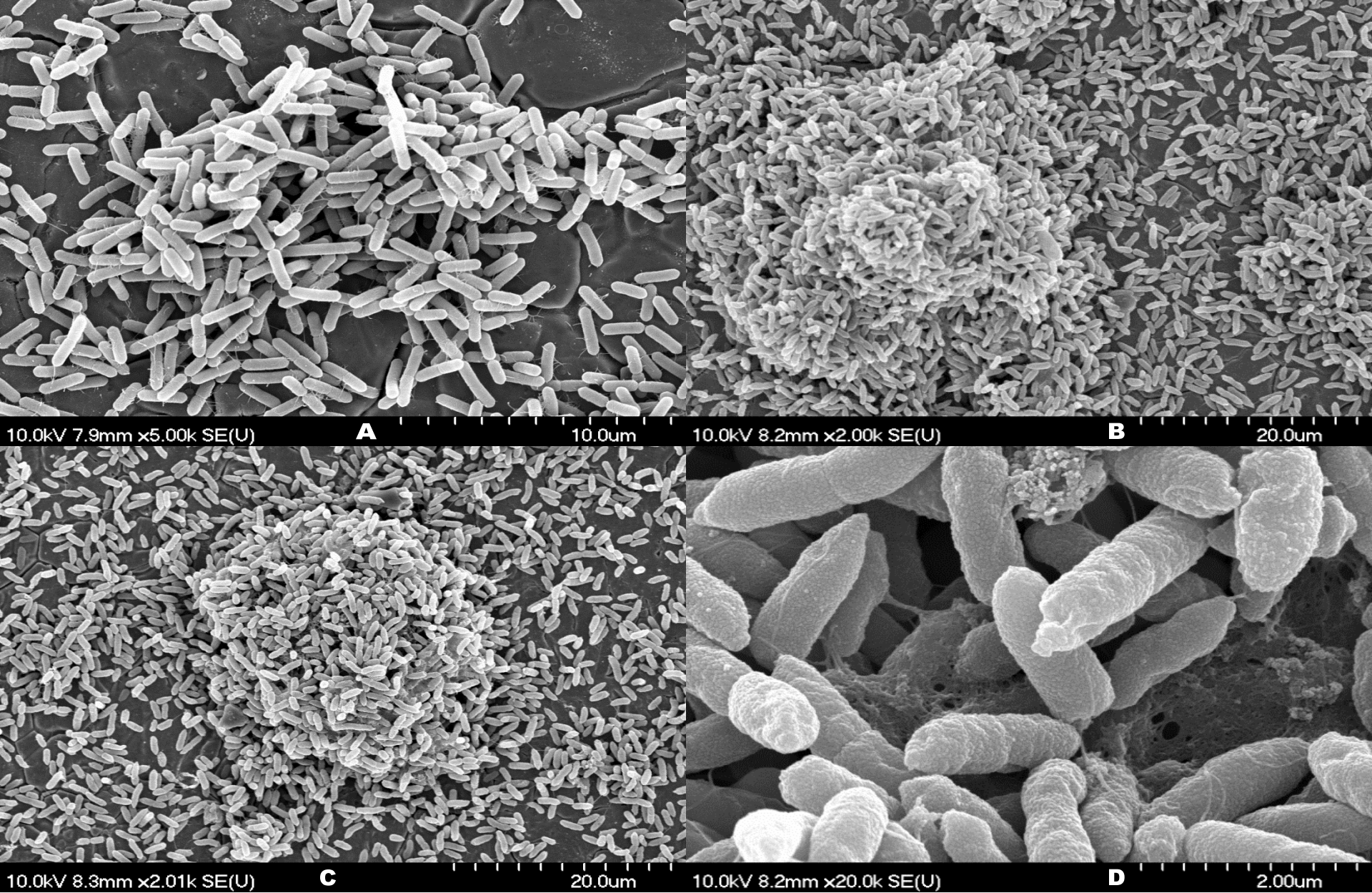


- Efter 20 dage var der ingen forskel mellem antallet af overlevende på overflader med 20 og 60% mættet fedt

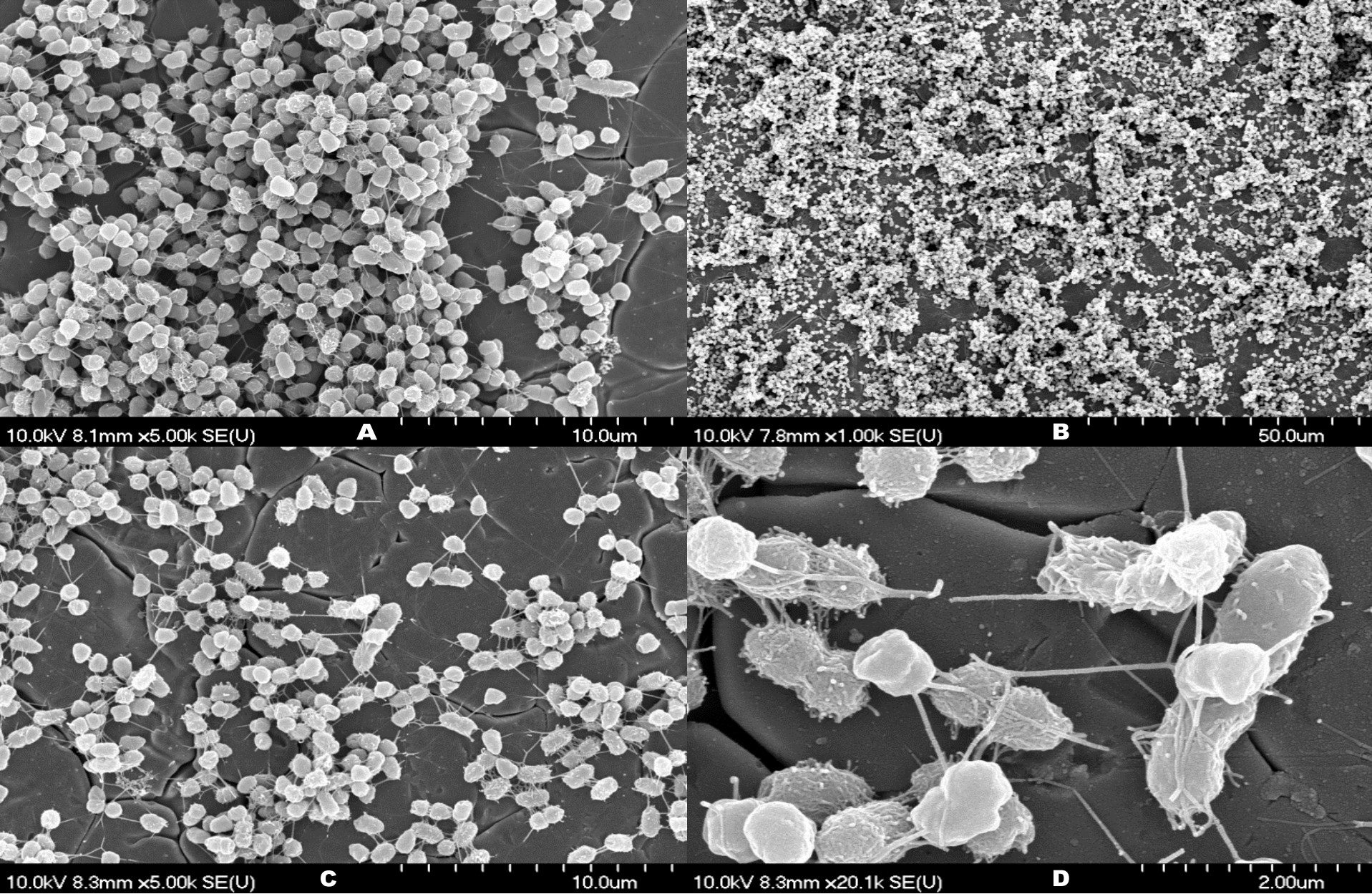
Konkurrence mellem bakterier under biofilmdannelse

- Bakterier kan hæmme hinanden under biofilmdannelse
- Den der vokser hurtigst vinder!
- *Pseudomonas*, en fordærvelsesbakterier, vokser hurtigere end *Listeria*
- I en blandet kultur udkonkurrerer *Pseudomonas* (rød kant, hvide trekanteder) *Listeria* (blå kant, hvid cikler)!

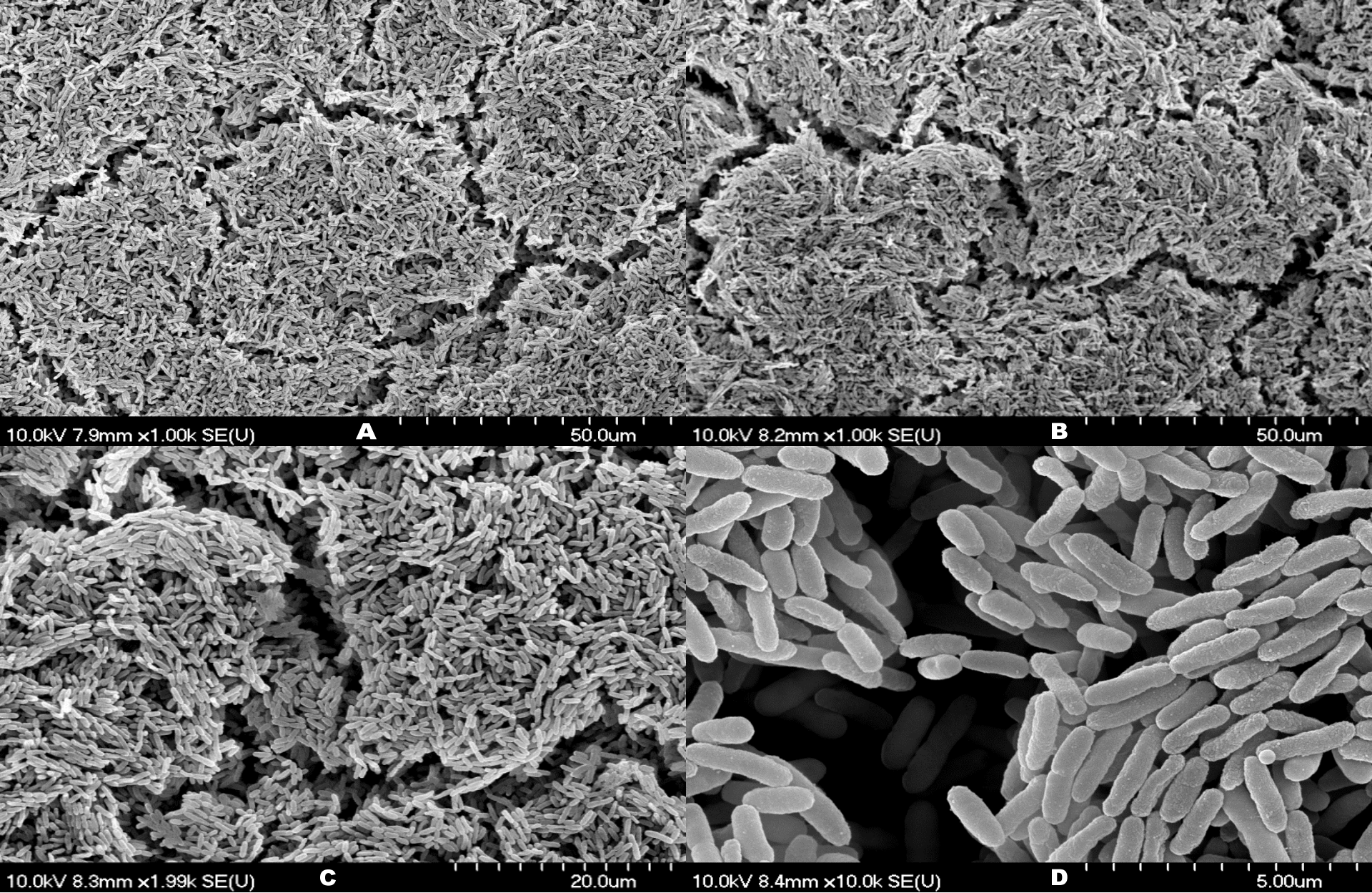




Figur. Skanning elektron mikroskopi billeder taget af *L. monocytogenes* og *P. fluorescens* (hhv A & C) og blandede biofilm (B & D). Biofilmene blev dannet på rustfrit stål overflader (48 timer, 100% RH & 15°C) og fikseret med en modificeret cacodylate buffer.



Figur. SEM billeder af *S. liquefaciens* enkelt kultur (A) og blandet biofilm med *L. monocytogenes* (B, C & D). Biofilmene blev dannet på rustfrit stål overflader (48 timer, 100% RH & 15°C) og fikseret med en modificeret cacodylate buffer.



Figur. SEM billeder af *Sh. putrefaciens* i enkelt kultur (A) eller blandet biofilm (B, C & D) med *L. monocytogenes*. Biofilmene blev dannet på rustfrit stål overflader (48 timer, 100% RH & 15°C) og fikseret med en modificeret cacodylate buffer.

Konklusioner

- Biofilmdannelse på rustfrit stål virker beskyttende på bakterier inklusive patogener som *L. monocytogenes* og nedsætter virkningen af rengøring og desinfektion
- Udstyr med dårligt hygiejnisk design vanskeliggør rengøring og forhindring af biofilmdannelse
- Tilbageværende snavs (salt, fedt, protein, osv.) og biofilm beskytter bakterier under udtørring
- Konkurrence under biofilmdannelse kan ændre sammensætningen af mikrofloraen, så dem der laver mest EPS har en fordel
- Mere EPS (biofilm slim → sværere at fjerne biofilm)