

## GDK Hygiene Projekt

Die Konservierung und Lagerung biologischer Ressourcen in Biobanken sind für die zukünftige Forschung, öffentliche Gesundheit und Bioökonomie von grundlegender Bedeutung. Die Kryokonservierung und die Lagerung von biologischem Material bei extrem niedrigen Temperaturen, üblicherweise in flüssigem Stickstoff (LN) bei  $-196\text{ °C}$  oder in der LN-Dampfphase (zwischen  $-140$  und  $-180\text{ °C}$ ), ist eine Schlüsselkomponente des modernen Biobankings um metabolische, physikalische und chemische Veränderungen des Materials auch bei längerer Lagerung zu vermeiden. Nationale und internationale Netzwerke, wie die Gemeinschaft Deutscher Kryobanken (GDK), bündeln Wissen und Infrastruktur um gemeinsame Sicherheitsmaßnahmen und standardisierte Verfahren zu entwickeln, da hohe Qualitäts- und Hygienestandards eine Grundvoraussetzung für eine sichere und saubere Lagerung biologischer Proben sind. Einzelne Studien über Bakterienisolate aus Kryotanks und Probenkontaminationen nach der Lagerung im Flüssigstickstoff lassen vermuten, dass Organismen in den Kryotanks verbleiben können [1, 2]. Um zu bewerten, welche Organismen in Kryotanks vorkommen, wurden im Rahmen des von der GDK initiierten und geförderten Hygiene-Projektes systematisch die LN- und Eisphasen in Kryotanks von zehn Biobanken auf das Vorhandensein von Bakterien, Pilzen, pflanzlichen und menschlichen Zellen untersucht. Mit Hilfe mikroskopischer und Kultur-unabhängiger molekularer Methoden konnten mögliche Eintrittswege identifiziert und verbesserte Strategien für das Qualitätsmanagement abgeleitet werden. Die Studie zeigte, dass die Bakterienbelastung in LN-Tanks gering ( $10^4$  Zellen und bis zu  $10^6$  Genkopien pro ml Eis) oder unter der Nachweisgrenze (LN-Proben) ist und mit zunehmender Lagerzeit und der Anzahl der Öffnungen zunimmt. Mikroorganismen können über die technische Umgebung in die Kryotanks gelangen (wie *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium*), außerdem wurden das menschliche Mikrobiom (*Bacteroides*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*) oder das gelagerte Material selbst (*Elizabethkingia*, *Janthibacterium*) als mögliche Quellen identifiziert. Basierend auf unseren Ergebnissen kann die geringe Bakterienbelastung von Eis- und Sedimentproben durch die Verringerung der Eisbildung und die Vermeidung von physischem Kontakt mit diesen Quellen, sowie durch die Verwendung hermetisch verschlossener Probenbehälter (thermisch versiegelte Straws, Glaskapillaren) weiter minimiert werden. Die Ergebnisse der Studie wurden veröffentlicht und auf Tagungen vorgestellt [3-5].

## GDK Hygiene Project

The conservation and storage of biological resources in biobanks are fundamental to future research, public health and the bioeconomy. The cryopreservation and storage of biological material at extremely low temperatures, usually in liquid nitrogen (LN) at  $-196\text{ °C}$  or in the LN vapor phase (between  $-140$  and  $-180\text{ °C}$ ), is a key component of modern biobanking to avoid metabolic, physical or chemical changes of the material, even during long-term storage. National and international networks, such as the Gemeinschaft Deutscher Kryobanken (GDK), bundle knowledge and infrastructure in order to develop common security measures and standardized procedures, since high quality and hygiene standards are a basic requirement for safe and clean storage of biological samples. Individual reports on bacterial isolates from cryotanks and sample contamination after storage in liquid nitrogen suggest that organisms can persist in the cryotanks [1, 2]. In order to evaluate which organisms occur in cryotanks, the LN and ice phases in cryotanks of ten biobanks were systematically examined for the presence of bacteria, fungi, plant and human cells as part of

the GDK-initiated and funded hygiene project. Using state-of-the-art microscopy and culture-independent molecular methods, potential entry routes could be identified and suitable strategies for quality management derived. The study showed that the bacterial load in LN tanks is low ( $10^4$  cells and up to  $10^6$  gene copies per ml of ice) or below the detection limit (LN samples) and increases with increasing storage time and the number of openings. The microorganisms can enter the cryotanks via the technical environment (such as *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium*), and the human microbiome (*Bacteroides*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*) or the stored material itself (*Elizabethkingia*, *Janthibacterium*) have been identified as possible sources. Based on our results, the low bacterial load in ice and sediment samples can be further minimized by reducing ice formation and avoiding physical contact with these sources, as well as by using hermetically sealed sample containers (thermally sealed straws, glass capillaries). The results of the study have been published and presented on conferences [3-5].

1. Ramin, M., et al., *Stability of Cryopreserved Samples of Mutant Mice*. Biopreservation and biobanking, 2014. **12**(5): p. 343-350.
2. Fountain, D., et al., *Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components*. Transfusion, 1997. **37**(6): p. 585-591.
3. Bajerski, F., et al., *Factors determining microbial colonization of liquid nitrogen storage tanks used for archiving biological samples*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020. **104**(1): p. 131-144.
4. Bajerski, F., Bürger, A., Glasmacher, B., Keller, E.R.J., Müller, K., Mühldorfer, K., Nagel, M., Rüdell, H., Müller, T., Schenkel, J., and Overmann. *Welche Faktoren beeinflussen das Vorhandensein von Mikroorganismen in Kryotanks? – Ein Kulturunabhängiger Ansatz*. in *Deutsche Klima- und Kältetagung 2020*. 2020. online.
5. Bajerski, F., Bürger, A., Glasmacher, B., Keller, E.R.J., Müller, K., Mühldorfer, K., Nagel, M., Rüdell, H., Müller, T., Schenkel, J., and Overmann, J. . *Life in the Freezer?! – A culture-independent approach to assess potential microbial colonization of liquid nitrogen storage tanks*. in *6th Joint Conference of DGHM & VAAM, 72nd Annual Meeting German Society for Hygiene and Microbiology and Annual Meeting 2020 Association for General and Applied Microbiology*. 2020. Leipzig.

Copyright © 2019, F. Bajerski, A. Bürger, B. Glasmacher, E. R. J. Keller, K. Müller, K. Mühldorfer, M. Nagel, H. Rüdell, T. Müller J. Schenkel, & J. Overmann, translated and modified [Applied Microbiology and Biotechnology, volume 104, pages 131–144 (2020).  
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10242-1>  
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/#>