

Biokontrolle von *Pseudomonas*- Verderbniserregern auf Oberflächen in milchproduzierenden Betrieben durch Bakteriophagen



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungseinrichtung(en):	Max-Rubner-Institut (MRI) Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kiel Prof. Dr. Charles Franz/Dr. Frank Hille/Dr. Natalia Biere
Industriegruppe(n):	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
Projektkoordinator:	Dr. Ralf Zink DMK Deutsches Milchkontor GmbH, Bremen
Laufzeit:	2022 – 2025
Zuwendungssumme:	€ 275.000,--

Ausgangssituation

Pseudomonaden gehören zu den am weitesten verbreiteten psychrophilen (kälteliebenden) Verderbniserregern, besonders in aerob gelagerten Lebensmitteln mit einem hohen Wassergehalt und einem neutralen pH-Wert, wie Fleisch, Fisch, Geflügel und Milch.

Pseudomonaden in Rohmilch werden zwar durch Hitzebehandlungen inaktiviert, problematisch ist aber die Produktion von hitzestabilen Enzymen durch diese Bakterien, da viele der protein- und fettabbauenden Enzyme nach Sterilisationsverfahren, wie einer Pasteurisation oder einer UHT-Behandlung, weiter aktiv bleiben und damit die Qualität und Sensorik, das optische Erscheinungsbild und die Haltbarkeit der Milch auf Dauer stark beeinträchtigt werden. Zudem kann die Bildung dieser Enzyme durch ausgedehnte Lagerzeiten bei niedrigen Temperaturen bei den Milcherzeugern oder in Molkereibetrieben sogar begünstigt werden, da solche Bedingungen einen selektiven Vorteil für psychrophile *Pseudomonaden* bieten.

Im Rahmen des IGF-Vorhabens 20027 N konnten bereits direkte Eintragsrouten der Bakterien in die Milch identifiziert werden. Besonders Stellen am Melkzeug und im Melksystem, die von der automatischen Reinigung schwer erfasst werden, zeigten z. T. einen sichtbaren mikrobiellen Bewuchs und eine entsprechend hohe Belastung mit *Pseudomonaden*. Grundsätzlich wurden auf Gummioberflächen, besonders Dichtungen, die höchsten *Pseudomonas*-Keimzahlen ermittelt. Grund hierfür könnte eine leichtere Adhäsion von Bakterien an diese Oberflächen sein, was die Bildung mikrobieller Biofilme begünstigen würde. Als Biofilm wird ein physiologischer Wachstumszustand von Mikroben bezeichnet, bei dem sich freischwimmende (planktonische) Zellen an einer Oberfläche ansiedeln und sich in eine Schleimschicht bestehend aus verschiedenen extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) einbetten. Der resultierende Biofilm ist durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Desinfektions- und Reinigungsmitteln gekennzeichnet, da chemische Substanzen die Schleimschicht (auch

Biofilmmatrix genannt) unter Umständen nur schwer penetrieren können. Ergebnisse des IGF-Vorhabens 20027 N sowie weitere Studien belegen zudem, dass die Produktion proteolytischer und lipolytischer Enzyme durch biofilmassoziierte Bakterien deutlich erhöht ist, was bei unzureichender Reinigung von Melkequipment zu einer kontinuierlichen Kontamination der Rohmilch führen kann.

Zu den gängigen Hygienemaßnahmen in milchproduzierenden Betrieben gehören der Einsatz chemischer Desinfektions- und Reinigungsmittel sowie strikte Hygienevorschriften. Der Einsatz von Standardreinigern reicht jedoch oftmals nicht aus, um bakterielle Biofilme effektiv von schwer zugänglichen Oberflächen zu entfernen. Eine vielversprechende Ergänzung zu etablierten Verfahren stellt die Biokontrolle durch Bakteriophagen dar (kurz: Phagen), d. h. von Viren, die spezifisch Bakterien infizieren und selektiv abtöten. Es sind bereits mehrere kommerzielle Phagenprodukte (z.B. EcoShield®, SalmoFresh™, ListShield) auf dem internationalen Markt erhältlich, die zur Biokontrolle von verschiedenen pathogenen Bakterien (z.B. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) in lebensmittelrelevanten Bereichen Einsatz finden. Die Nutzung geeigneter Phagen-Cocktails zur Biokontrolle von *Pseudomonaden* ist bisher jedoch noch keine gängige Praxis.

Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, die Wirksamkeit von Phagen zur Beseitigung von verderbnisrelevanten *Pseudomonas*-Bakterien zu untersuchen, um Phagen gegen relevante Milchverderbsorganismen der *Pseudomonas*-Gruppe zu identifizieren und deren Effizienz als Agenzien zur Biokontrolle im praxisnahen Maßstab zu bewerten, wobei das Augenmerk auf der Beseitigung von Multispezies-Biofilmen lag.

Forschungsergebnisse

Im Rahmen des Vorhabens wurden aus unterschiedlichen Umweltproben insgesamt 36 Bakteriophagen isoliert, die eine lytische Aktivität gegenüber verderbnisrelevanten *Pseudomonas*-Stämmen zeigten. Von diesen Phagen erwiesen sich 29 als genomisch eindeutig unterscheidbar und wurden näher charakterisiert. Die Untersuchungen der Wirtsspektren auf Fest- und in Flüssigmedium zeigten deutliche Unterschiede in der Infektionseffizienz der einzelnen Phagen in Abhängigkeit vom Versuchsansatz. Während einzelne Phagen in Flüssigkultur eine hohe Aktivität aufwiesen, erwies sich die Analyse auf Festmedium als besser geeignet, um biofilmrelevante Eigenschaften abzubilden. Auf dieser Grundlage wurde eine Auswahl geeigneter Phagen für weiterführende Untersuchungen getroffen.

Parallel dazu wurde ein Langzeit-Biofilm-Monitoring auf fünf milchproduzierenden Betrieben durchgeführt. Über acht Quartale hinweg wurden Biofilmproben von kritischen Stellen entnommen und mikrobiologisch sowie molekularbiologisch analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Biofilme eine hohe mikrobielle Diversität aufweisen und sich aus einer relativ stabilen Kernmikrobiota sowie einer variablen, hof- und zeitabhängigen Zusatzflora zusammensetzen. *Pseudomonas*-Spezies waren dabei insgesamt nicht dauerhaft dominant, traten jedoch in einzelnen Proben zeitweise in erhöhter Abundanz auf. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Biofilmbelastung stark vom jeweiligen Betrieb, der technischen Ausstattung und dem Reinigungsmanagement beeinflusst wird.

Die Untersuchungen zur Wirksamkeit von Phagen gegenüber Biofilmen ergaben differenzierte Ergebnisse. Eine besonders ausgeprägte Wirkung wurde beim präventiven Einsatz beobachtet. Die Neubildung von Biofilmen konnte durch Phagen deutlich gehemmt werden, wobei Phagencocktails im Vergleich zu Einzelphagen eine stärkere Wirkung zeigten. Die Wirksamkeit von Phagen auf bereits etablierten Biofilmen war hingegen deutlich eingeschränkter. Die Effekte waren dabei stark abhängig von der Oberfläche, auf der die Biofilme gewachsen waren. Während Biofilme auf Metalloberflächen reduziert werden konnten, zeigte sich auf Biofilmen auf Gummioberflächen eine deutlich geringere Wirksamkeit. Darüber hinaus erwiesen sich Biofilme, die aus mehr als einer Wirtsspezies bestanden, als weitgehend unempfindlich gegenüber einer alleinigen Phagenbehandlung.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Untersuchung der Resistenzbildung gegenüber Phagen. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch beim Einsatz eines Phagencocktails aus mehreren Phagen phagenresistente *Pseudomonas*-Kolonien entstehen können. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Einsatz von Phagencocktails das

Risiko einer Resistenzbildung nicht vollständig ausschließt und dieser Aspekt bei zukünftigen Anwendungskonzepten berücksichtigt werden muss.

Ein zentrales Ergebnis des Vorhabens war der Nachweis eines klaren synergistischen Effekts bei der kombinierten Anwendung von Phagen mit etablierten Säure-Lauge-Reinigern. Durch diese Kombination konnten auch etablierte Biofilme effizient reduziert werden, während Einzelanwendungen deutlich weniger wirksam waren. Die Ergebnisse zeigen, dass Phagen insbesondere als ergänzende Maßnahme bestehender Reinigungsverfahren sinnvoll eingesetzt werden können.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Phagen insbesondere im präventiven Einsatz sowie in Kombination mit chemischen Reinigungsverfahren ein Potenzial zur Kontrolle von *Pseudomonas*-Biofilmen besitzen, während die Grenzen einer alleinigen phagenbasierten Biofilmbekämpfung klar aufgezeigt wurden. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern damit eine fundierte Grundlage für die Weiterentwicklung realistischer, kombinierter Hygienestrategien in milchproduzierenden Betrieben.

Wirtschaftliche Bedeutung

Die Milcherzeugung und Milchverarbeitung gehören zu den bedeutendsten Wirtschaftsbereichen im deutschen Agrar- und Ernährungssektor. Deutschland zählt zu den größten Erzeugern von Kuhmilch innerhalb der Europäischen Union und lieferte 2024 rund 31,3 Millionen Tonnen Rohmilch an Molkereien, davon etwa 4,5 % aus ökologischer Erzeugung. Die Molkereiunternehmen in Deutschland erzielten im Jahr 2024 einen Umsatz von rund 39,6 Mrd. €, was im Vergleich zu früheren Jahren eine deutliche Steigerung darstellt. Ca. 50 % der erzeugten Milch wurde 2024 in Form verschiedener Produkte exportiert, was einem Anteil des Exports am Gesamtumsatz von etwa 30 % entspricht.

Genauere Zahlen zum ökonomischen Schaden durch mikrobiellen Verderb im milchverarbeitenden Sektor werden statistisch nicht erhoben, belaufen sich weltweit laut Schätzungen jedoch auf ca. 20-30 %. Einen überdurchschnittlichen Anteil der aus Milch isolierten psychrotrophen Bakterien gehören der Gattung *Pseudomonas* an. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine Kontamination mit Pseudomonaden auch in Deutschland erhebliche finanzielle Schäden in Milliardenhöhe durch Qualitätsminderungen und Verderb verursacht.

Eine Anwendung von Phagen bietet daher milchverarbeitenden Betrieben, insbesondere KMU, die Möglichkeit, Produktionsverluste zu reduzieren, indem verderbnisfördernde Pseudomonaden inaktiviert werden und somit die Bildung von verderbnisrelevanten und hitzeresistenten Enzymen, wie z. B. Lipasen und Proteasen, verhindert wird. KMU sind in besonderem Maße von mikrobiell bedingten Qualitätsminderungen betroffen, da sie häufig mit begrenzten personellen, technischen und finanziellen Ressourcen arbeiten und auf stabile Prozesse sowie eine hohe Produktsicherheit angewiesen sind. Ein sicheres Produkt, welches weniger Verderbniserreger der Gattung *Pseudomonas* enthält und in dem keine verderbnisrelevanten Enzyme vorkommen, steigert daher die Haltbarkeit und damit auch die Wirtschaftlichkeit der Herstellung in verschiedenen Stationen der Produktionspipeline bis hin zum Konsum.

Der im Rahmen dieses Projektes untersuchte Einsatz von *Pseudomonas*-spezifischen Phagen diente dabei zunächst der Evaluation des Konzepts der Biokontrolle von biofilmassoziierten Pseudomonaden in praxisnahen Modellversuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen eine realistische Einschätzung des Potenzials und der Grenzen des Phageneinsatzes und zeigten, dass insbesondere der präventive Einsatz von Phagen sowie deren Kombination mit etablierten Reinigungsmitteln Ansatzpunkte bieten um bestehende Hygienekonzepte gezielt weiterzuentwickeln, ohne bestehende Prozesse grundlegend verändern zu müssen. Für KMU bedeutet dies, dass durch eine gezielte präventive Anwendung das Risiko einer Biofilmentstehung reduziert und damit der Aufwand für nachgelagerte, kostenintensive Reinigungsmaßnahmen verringert werden kann.

Publikationen (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht 2025
2. Hille, F., Gieschler, S., Brinks, E. & Franz, C. M. A. P: Characterisation of the Novel Filamentous Phage PMBT54 Infecting the Milk Spoilage Bacteria Pseudomonas carnis and Pseudomonas lactis; Viruses, 15(9):1781, doi: 10.3390/v15091781 (2023).

Weiteres Informationsmaterial

Max-Rubner-Institut (MRI)
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (Kiel)
Hermann-Weigmann-Straße 1, 24103 Kiel
Tel.: +49 431 609-2340
Fax: +49 431 609-2306
E-Mail: charles.franz@mri.bund.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Förderhinweis

... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWE) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Bildnachweis - Seite 1: ©Toh Kheng Guan - stock.adobe.com #8412359

Stand: 30. März 2026