

Sicherheitsabklärungen für die Liebefelder Kulturen

Hans-Peter Bachmann, Christoph Kohn, Ueli von Ah und Noam Shani

Agroscope, 3003 Bern, Schweiz

Auskünfte: Hans-Peter Bachmann, E-Mail: hans-peter.bachmann@agroscope.admin.ch



Abb. 1 | Die Liebefelder Kulturen werden in flüssiger und lyophilisierter Form angeboten.

(Foto: Carole Parodi, Agroscope)

Einleitung

Zur Herstellung von fermentierten Lebensmitteln werden mikrobielle Kulturen zugesetzt. Da die in diesen Kulturen enthaltenen Bakterien im Endprodukt in grossen Mengen vorkommen, müssen sie bestimmte Sicherheitsanforderungen erfüllen, damit unerwünschte Auswirkungen auf die Konsumentinnen und Konsumenten ausgeschlossen werden können. Traditionelle fermentierte Lebensmittel und die dabei verwendeten mikrobiellen Kulturen haben eine «lange Geschichte einer sicheren Verwendung» (Englisch: «long history of safe use»), aufgrund derer sie vernünftigerweise als sicher gelten können. Agroscope entwickelt und produziert im Rahmen einer *Public-Private-Partnership* (PPP) ein breites Sortiment an mikrobiellen Kulturen (Abb. 1).

In der EU und in der Schweiz gibt es keine spezifischen gesetzlichen Bestimmungen für mikrobielle Kulturen zur Herstellung von Lebensmitteln. Es gilt die allgemeine

Regelung, dass Lebensmittel nicht in Verkehr gebracht werden dürfen, wenn sie nicht sicher sind. Die Lebensmittelsicherheit muss vom Hersteller gewährleistet werden. Eine Marktzulassung ist für Kulturen nicht erforderlich, ausser wenn sie Spezies enthalten, die keine «long history of safe use» aufweisen.

Ein Inventar von Mikroorganismen mit dokumentierter Beteiligung an der Fermentation von Lebensmitteln wurde 2002 veröffentlicht und 2018 aktualisiert (Bourdichon *et al.* 2018). Die EFSA, die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, führte 2005 ein Konzept basierend auf einer «qualifizierten Sicherheitsannahme» («Qualified Presumption of Safety», QPS) ein, um das Bewertungsverfahren für Mikroorganismen, von denen ein geringes Risiko ausgeht, zu vereinfachen und zu vereinheitlichen. Einer bestimmten Spezies wird der QPS-Status zuerkannt, falls es keine Bedenken hinsichtlich der Sicher-

heit gibt oder falls allfällige Bedenken durch Studien ausgeräumt werden können. Zusätzlich wurden für ausgewählte Spezies Empfehlungen in Form von «Qualifikationen» formuliert. So können unnötige Studien vermieden werden, ohne die Sicherheit zu gefährden (Leuschner *et al.* 2010).

Die meisten Milchsäurebakterien, welche für die Herstellung von fermentierten Milchprodukten und für viele weitere fermentierte Lebensmittel verwendet werden, haben den QPS-Status erhalten und es sind somit keine besonderen Bewertungen erforderlich (Tab. 1).

Die EFSA legt jedoch klar fest, dass jeder Stamm, selbst wenn er über den QPS-Status verfügt, frei von erworbenen und übertragbaren Antibiotika-Resistenz-Genen sein muss, die klinisch relevant sind. Damit soll vermieden werden, dass Antibiotika-Resistenz-Gene von den harmlosen Milchsäurebakterien auf gefährliche Krankheitserreger übertragen werden. Ein solcher Gentransfer könnte im schlimmsten Fall dazu führen, dass Infektionskrankheiten kaum mehr therapierbar sind, weil die Erreger multi-resistent sind. Auch viele wichtige Operationen (Organtransplantationen, Kaiserschnitt, Hüftgelenkersatz usw.) sowie die Chemotherapie bei der Krebsbekämpfung sind auf wirkungsvolle Antibiotika angewiesen (WHO 2018). Die Übertragung der Resistenzgene erfolgt über einen horizontalen Gentransfer, wobei die Weitergabe von Plasmiden der häufigste Weg ist (von Wintersdorff *et al.* 2016). Die zur Herstellung fermentierter Lebensmittel verwendeten Mikroorganismen müssen deshalb unbedingt frei von erworbenen und übertragbaren Resistenzgenen sein.

Klar zu unterscheiden von den erworbenen und übertragbaren Resistenzgenen, ist die Tatsache, dass ein Bakterium natürlicherweise resistent gegenüber einem Antibiotikum sein kann. Man spricht in diesem Fall von einer intrinsischen Resistenz. Diese kann nicht einfach mittels horizontalem Gentransfer zwischen Mikroorganismen übertragen werden. So ist *Lactobacillus casei* intrinsisch resistent gegenüber Vancomycin, da die Zellwand eine strukturelle Besonderheit aufweist (Billot-Klein *et al.* 1994).

Es gibt keine eindeutige Vorschrift, wie die Prüfung erfolgen muss ob ein Stamm eine übertragbare Antibiotika-Resistenz aufweist. Das EFSA Panel «on Additives and Products or Substances used in Animal Feed» (FEEDAP) hat eine Richtlinie für Futtermittelzusätze erarbeitet (EFSA 2012). Diese Richtlinie trägt den Titel einer «Scientific Opinion» und ist eine gute und breit akzeptierte Grundlage, um Stämme zu beurteilen, die für die Herstellung von fermentierten Lebensmitteln eingesetzt werden (Abb. 2).

Zusammenfassung

Die mikrobiellen Stämme, die Agroscope für Praxisversuche verwendet und die bei Erfolg anschliessend Bestandteil einer definierten Mischkultur werden, müssen eine hohe Sicherheit aufweisen. Aus der Agroscope Stammsammlung wurden 164 Stämme von Milchsäurebakterien auf ihre Sicherheit hinsichtlich übertragbarer Antibiotika-Resistenzen, der Bildung von biogenen Aminen und der Anwesenheit von Virulenzfaktoren überprüft. Nur sechs Stämme mussten ausgeschlossen werden, da sie eine oder mehrere übertragbare Antibiotika-Resistenzen aufwiesen. Diese Stämme wurden erst vor wenigen Jahren isoliert. Die meisten Stämme aus der Stammsammlung wurden hingegen vor mehreren Jahrzehnten isoliert, zu einer Zeit, als sich die Resistenzen noch nicht ausgebreitet hatten. Die Stammsammlung ist auch wegen der hohen Biodiversität und der grossen Anzahl von Stämmen von einem unschätzbaren Wert.

Neben den erworbenen Antibiotika-Resistenz-Genen gibt es in zwei weiteren Bereichen Anforderungen an die Sicherheit von mikrobiellen Kulturen: Sie sollten keine biogenen Amine bilden und keine kritischen Virulenzfaktoren tragen. Die biogenen Amine entstehen bei der Decarboxylierung von Aminosäuren. Die Mikroorganismen, die für die Kulturen verwendet werden, sollten demnach keine Histidin- und keine Tyrosin-Decarboxylase aufweisen, damit sie kein Histamin und kein Tyramin – die beiden bedeutsamsten biogenen Amine im Käse – bilden.

Virulenzfaktoren sind von einem pathogenen Mikroorganismus hergestellte Stoffe, welche es diesem ermöglichen, die Infektion einzuleiten, in der feindlichen Umgebung des Wirts zu überleben und eine Krankheit hervorzurufen (Chen *et al.* 2016). Stämme, die für Kulturen verwendet werden, sollten keine Virulenzfaktoren aufweisen, selbst wenn sie zu einer Spezies gehören, welche über den QPS-Status verfügt. Mit Hilfe von Datenbanken lässt sich ein schnelles Screening der Genome vornehmen. Die Ergebnisse sind allerdings schwierig zu interpretieren. Ein Gen, welches es dem betreffenden Stamm ermöglicht, den Darm zu besiedeln, ist bei pathogenen Bakterien eindeutig ein Virulenzfaktor, bei einer kommensalen («mitessenden») Spezies ist es hingegen erwünscht.

Ein wichtiger Bestandteil der Sicherheit von Kulturen ist auch, dass bei der Produktion keine Kontamination mit pathogenen Keimen erfolgt. Dieser Aspekt ist Teil der Guten Herstellungspraxis und wird hier nicht behandelt.

Material und Methoden

Alle Stämme wurden an der *Next Generation Sequencing* (NGS) Plattform der Universität Bern, mittels der Illumina-Technologie vollgenomsequenziert und an der *Interfaculty Bioinformatics Unit* der Universität Bern assembliert und annotiert und in die interne Datenbank Dialact eingepflegt.

Das Vorgehen bei den Sicherheitsabklärungen basierte stark auf den Empfehlungen der EFSA (Abb. 3). Die Antibiotikaresistenz wurde mit zwei sich ergänzenden Ansätzen (phänotypisch und genotypisch) geprüft. Die phänotypische Antibiotika-Resistenz wurde nach dem Standardprotokoll ISO 10932 | IDF 223:2010 für Milchsäurebakterien untersucht. Die damit bestimmte minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde mit mikrobiologischen Schwellenwerten (ECOFF-Werten für «ecological cut-offs») verglichen und die Stämme in die Kategorien «sensibel» oder «resistent» eingeteilt (EFSA 2012). Die

Vollgenomsequenzen wurden mit zwei verschiedenen, international breit akzeptierten und viel genutzten Web-Applikationen nach bekannten Antibiotika-Resistenz-Genen untersucht (Zankari *et al.* 2013). Die Nukleotidsequenzen wurden mittels ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>, abgerufen am 13.3.2019) geprüft und die Aminosäuresequenzen wurden mit einem Dialact-eigenen Werkzeug, welches auf BLAST basiert und erlaubt, die gesamte Datenbank abzusuchen mit den Vergleichssequenzen von ARG-ANNOT (<http://backup.mediterranee-infection.com/article.php?la-ref=282&titre=arg-annot>, abgerufen am 13.3.2019) abgeglichen. Eine Resistenz wurde als «nicht übertragbar» beurteilt, falls die ECOFFs verbreitet bei den Stämmen der gleichen Spezies überschritten wurden, bei der Genomanalyse aber kein entsprechendes Resistenz-Gen gefunden wurde (auch kein defektes Gen, das vielleicht dennoch eine gewisse Wirkung ausübt). Berücksichtigt bei der Synthese wurden auch die Herkunft des Stammes und der Zeitpunkt seiner Isolation sowie allfällig in der Literatur bereits beschriebene Erkenntnisse. Die Fähigkeit der Stämme zur Bildung biogener Amine kann mit verschiedenen sich ergänzenden Tests festgestellt werden. Die EFSA empfiehlt eine chemische Ana-

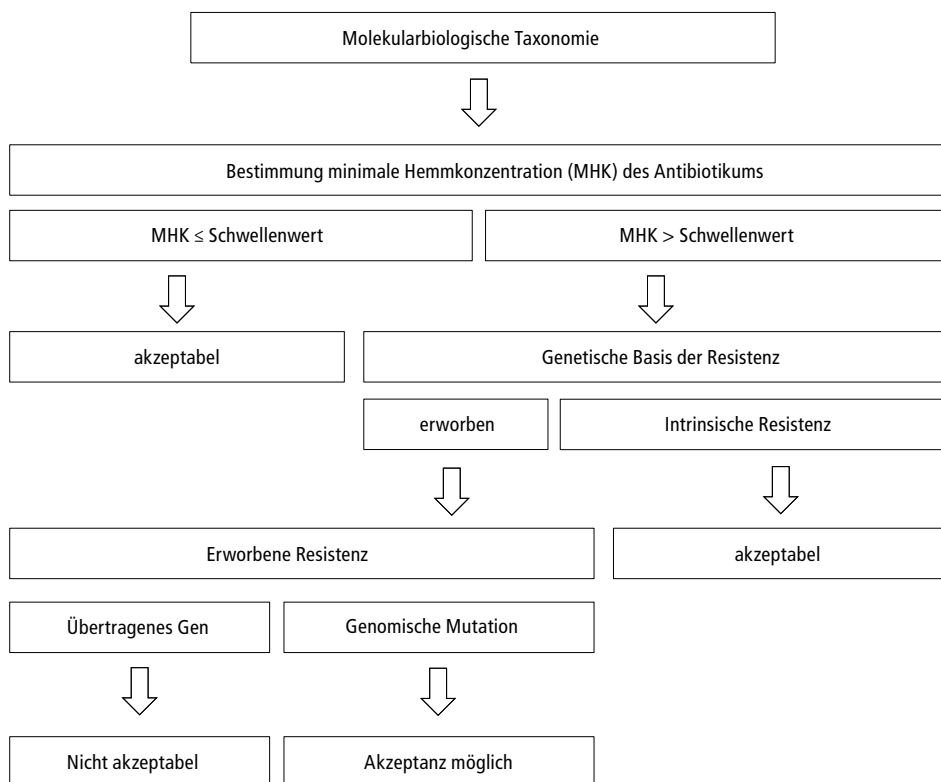


Abb. 2 | Vorschlag der EFSA für die Beurteilung der antimikrobiellen Resistenz von Bakterienstämmen, die als Futtermittelzusätze verwendet werden (EFSA 2012). MHK = minimale Hemmkonzentration.

Tab. 1 | Milchsäurebakterien, die den QPS-Status erhalten haben (Ricci et al. 2017).

Genus	Spezies
<i>Carnobacterium</i>	<i>divergens</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> , <i>amylolyticus</i> , <i>amylovorus</i> , <i>animalis</i> , <i>alimentarius</i> , <i>aviarius</i> , <i>brevis</i> , <i>buchneri</i> , <i>casei</i> ^a , <i>cellobiosus</i> , <i>collinoides</i> , <i>coryniformis</i> , <i>crispatus</i> , <i>curvatus</i> , <i>delbrueckii</i> , <i>diolivorans</i> , <i>farciminis</i> , <i>fermentum</i> , <i>gallinarum</i> , <i>gasseri</i> , <i>helveticus</i> , <i>hilgardii</i> , <i>johnsonii</i> , <i>kefiranoferiens</i> , <i>kefiri</i> , <i>mucosae</i> , <i>panis</i> , <i>paracasei</i> , <i>paraplantarum</i> , <i>pentosus</i> , <i>plantarum</i> , <i>pontis</i> , <i>reuteri</i> , <i>rhamnosus</i> , <i>sakei</i> , <i>salivarius</i> , <i>sanfranciscensis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i> , <i>lactis</i> , <i>mesenteroides</i> , <i>pseudomesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	<i>oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i> , <i>destrinicus</i> , <i>parvulus</i> , <i>pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>

^a*L. zaeae* wurde zusammen mit *L. casei* betrachtet.

lyse mittels Kultivierung des betreffenden Stammes in einem Nährmedium und anschliessender Messung der im Medium enthaltenen biogenen Amine. Alternativ können die Vollgenomsequenzen nach bekannten für Decarboxylasen codierende Gensequenzen abgesucht werden oder diese werden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) direkt bestimmt. Für die vorliegende Studie wurden die Nukleotidsequenzen der zu prüfenden Stämme mit Sequenzen von vier Tyrosin-Decarboxylasen (*Lactobacillus brevis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*) und zwei Histidin-Decarboxylasen (*Lactobacillus parabuchneri*, *Streptococcus thermophilus*) verglichen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Wiesen die phänotypische und/oder die genotypische Analyse auf das Vorhandensein einer unerwünschten Decarboxylase-Aktivität hin, wurde der Stamm ausgeschlossen.

Eine Methode zur Prüfung der Virulenzfaktoren ist nicht vorgeschrieben. Da zahlreiche Virulenzfaktoren beschrieben sind, ist der Nachweis mit phänotypischen Methoden sehr schwierig. Im Allgemeinen wird im Genom der untersuchten Stämme nach bekannten Virulenzgenen gesucht. Die Stämme von Agroscope wurden mit der Web-Applikation VFAnalyzer und der VFDB-Datenbank untersucht (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFAnalyzer>). Falls ein Virulenzfaktor gefunden wurde, erfolgte eine vertiefte Abklärung, um die nachfolgenden Fragen zu beantworten. Wie wird die betreffende Sequenz in verschiedenen Datenbanken annotiert? Wie wird das Risiko in der verfügbaren Literatur abgeschätzt? Ist die betroffene Sequenz nur beim untersuchten Stamm vorhanden oder kommt sie

Bioinformatische Instrumente zur Analyse der Sicherheit von Stämmen

Verschiedene bioinformatische Werkzeuge, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, ermöglichen in Bakteriengenomen die gezielte Suche nach Antibiotikaresistenz-Genen oder nach Sequenzen, die Virulenzfaktoren codieren. Im Rahmen der Prüfung der Sicherheit unserer Stämme wurden die folgenden Applikationen verwendet.

ResFinder (Zankari et al. 2012) v. 3.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>, abgerufen am 13.03.2019) kann Antibiotikaresistenz-Gene nachweisen, indem es das Genom der Stämme mit einer Datenbank aller bekannten Resistenzgene vergleicht. Diese Datenbank wird laufend aktualisiert. Der Nachweis basiert dabei auf dem Vergleich der Nukleinsäure-Sequenzen mit dem BLAST-Algorithmus (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation, Gupta et al. 2014) v. 4 (<http://backup.mediterranee-infection.com/article.php?leref=282&titre=arg-annot>, abgerufen am 13.03.2019) ermöglicht die Suche nach bekannten oder potenziell neuen Resistenzgenen mit dem BLAST-Algorithmus. Die verwendete Datenbank wird ebenfalls regelmässig aktualisiert. Bei dieser Applikation wurde im Rahmen unserer Forschung die Aminosäuresequenzen verglichen.

VFAnalyzer (Chen et al. 2005) (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFAnalyzer>, abgerufen am 13.03.2019) erlaubt den Nachweis von Genen, die potenzielle Virulenzfaktoren codieren. Dies durch einen Vergleich der Nukleinsäuresequenzen mit der VFDB-Datenbank, einer Sammlung von Genen, die in verschiedenen Datenbanken, wie z.B. Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), beschrieben sind.

innerhalb der gleichen Spezies sehr verbreitet vor? Von einigen Stämmen wurde zusätzlich ein phänotypischer Hämolyse-Test gemacht (Inkubation 24 h bei 30°C auf Schafsbloodagar). Aufgrund dieser Abklärung wurde entschieden, ob es sich um einen kritischen Befund handelt und der Stamm nicht verwendet werden darf.

Resultate und Diskussion

Ergebnisse von einzelnen Stämmen

Die Ergebnisse der Sicherheitsabklärungen von Milchsäurebakterien für Kulturen mit einer definierten Zusammensetzung sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Die Stämme der Stammsammlung Agroscope weisen insgesamt eine hohe Sicherheit auf. Von den insgesamt 164 geprüften Stämmen mussten nur sechs Stämme ausgeschlossen werden, da sie eine übertragbare Antibiotika-Resistenz aufweisen. Diese Stämme gehören allesamt zur Subspezies *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* und sie wurden aus roher Milch isoliert. Es ist bekannt, dass Laktokokken einen regen horizontalen Gentransfer haben können. Alle Stämme wurden nach 2003 isoliert. Dies ist ein starkes Indiz, dass die Wahrscheinlichkeit grösser geworden ist, Stämme mit einer erworbenen Antibiotika-Resistenz zu isolieren. Vier Stämme stammen aus roher Ziegenmilch aus dem Emmental, was aufzeigt wie verbreitet in der Zwischenzeit Antibiotika-Resistenzen

sein können. Die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Untersuchungsmethoden stimmen sehr gut überein (Tab. 3). Die Cut-Off-Values sind bei 1 (Erythromycin, Clindamycin) beziehungsweise 4 (Tetracyclin) mg/L (EFSA; 2012). Das *erm*-Gen kodiert die Erythromycinresistenz und eine konstitutive oder induzierbare Resistenz gegen Clindamycin und Streptogramin B. Erythromycin gehört in die Gruppe der Makrolidantibiotika.

Die nicht übertragbaren Resistenzen waren wie erwartet spezifisch für die Gattung beziehungsweise die Spezies. Bei *Leuconostoc* spp. und den homofermentativen Laktobazillen wurde häufig eine Kanamycin-Resistenz und bei den fakultativ heterofermentativen Laktobazillen eine Vancomycin-Resistenz festgestellt. Bei den Pediokokken weisen vier von elf untersuchten Stämmen eine nicht übertragbare Resistenz gegenüber Tetracyclin auf, was gut mit den Ergebnissen von Lüdin et al. 2018 übereinstimmt.

Bei den Virulenz-Faktoren wiesen alle untersuchten Stämme eine Sequenz auf, welche bei Clostridien für

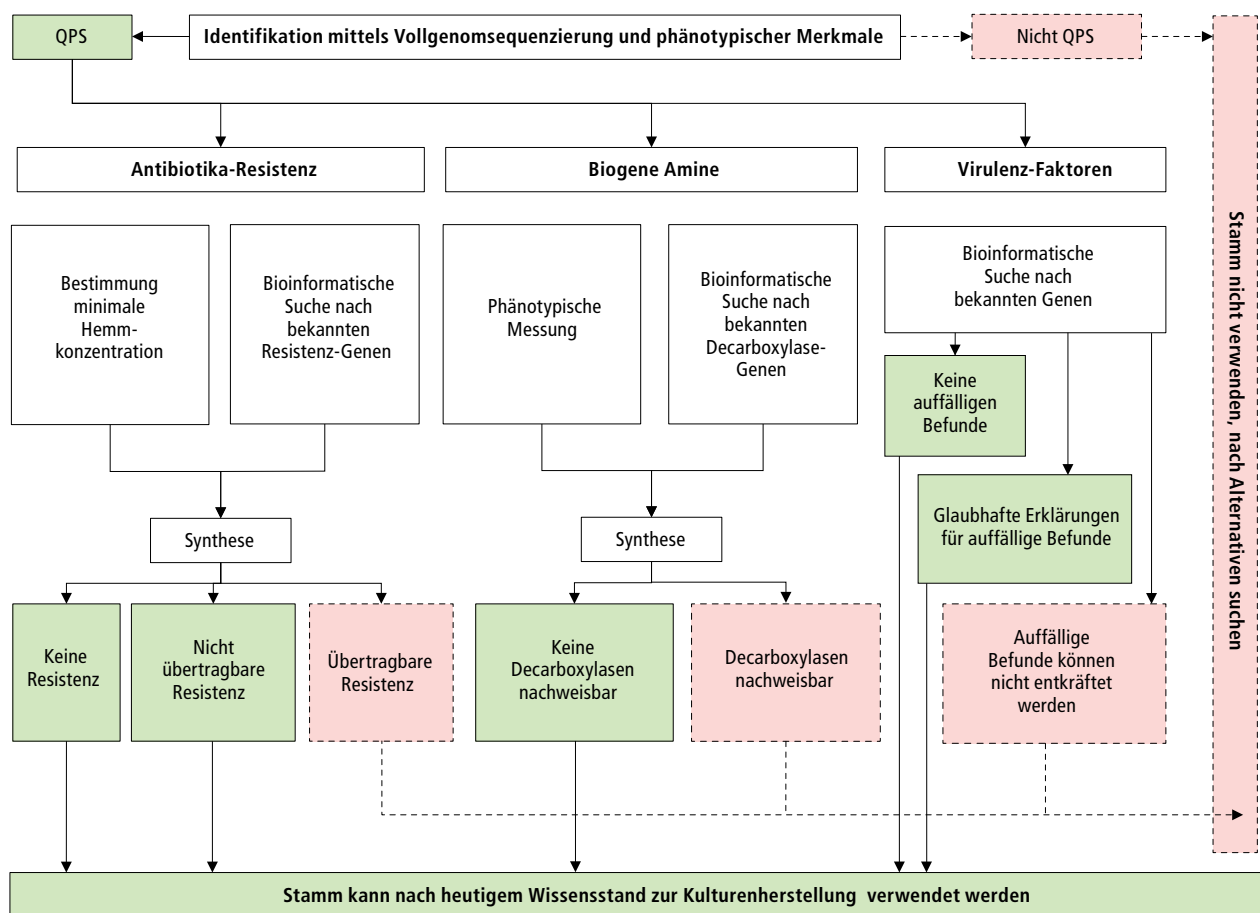


Abb. 3 | Vorgehen bei Agroscope bei der Prüfung der Sicherheit von Milchsäurebakterien-Stämmen für Kulturen mit einer definierten Zusammensetzung. QPS = «qualifizierte Sicherheitsannahme», «Qualified Presumption of Safety».

Tab. 2 | Ergebnisse der Sicherheitsabklärungen von Stämmen, die in den Versand- und Versuchskulturen eingesetzt werden.

Abklärungen		Anzahl geprüfte Stämme pro Genus				
Kriterien	Befund	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>
Antibiotikaresistenz	keine	71	21	21	15	7
	nicht übertragbar	0	0	2	16	4
	übertragbar	6	0	0	0	0
Decarboxylasen	keine	12	21	4	31	11
	vorhanden	0	0	0	0	0
Virulenzfaktoren	unauffällig	0	0	0	0	0
	erklärbar	12	21	4	31	11
	kritisch	0	0	0	0	0

ein Hämolsin codiert. Dieser Befund kann in dreierlei Hinsicht entkräftet werden. Erstens ist die entsprechende Sequenz in der Uniprot-Datenbank (<https://www.uniprot.org/>) als mutmassliche rRNA-Methyltransferase annotiert. Zweitens ist die Sequenz bei den Milchsäurebakterien sehr weit verbreitet, höchstwahrscheinlich sogar Bestandteil des Kerngenoms. Drittens wurde zur Sicherheit bei einigen Stämmen zusätzlich ein phänotypischer Hämolyse-Test gemacht. Alle untersuchten Stämme haben keinen Hof gebildet, machen also keine Hämolyse.

Spezialfall undefinierte Mischkulturen

Undefinierte Mischkulturen sind Mischungen von Stämmen verschiedener Spezies, die zusammenwirken, wobei die Stämme nicht isoliert zur Verfügung stehen. Diese Mischungen wurden auf empirische Weise gewonnen und sie gelten als traditionelle Kulturen. Das QPS-Konzept lässt sich nur eingeschränkt auf diese Kulturen anwenden und deren Sicherheitsbewertung ist nicht vorgeschrieben. Die vertretenen Spezies sind jedoch im Allgemeinen bekannt und es lassen sich eine Reihe von Analysen vornehmen, mit denen die Unbe-

denklichkeit solcher Kulturen bestmöglich sichergestellt werden kann:

- Die Kultur selber und auch die darin enthaltenden Spezies weisen eine «long history of safe use» auf
- In der Kultur kommen nur Spezies vor, die den QPS-Status haben und die Kultur ist frei von Fremdkeimen
- Die Kultur bildet keine biogenen Amine. Da bei PCR keine vorherige Isolierung des zu testenden Stammes erforderlich ist, können auch nicht definierte Mischkulturen untersucht werden. Alternativ kann eine chemische Analyse in einem Nährmedium oder direkt im fermentierten Lebensmittel erfolgen.

Etwas schwieriger gestalten sich die Abklärungen bei der Antibiotika-Resistenz. Die Empfehlungen der EU beziehen sich auf reine Stämme und sind für nicht definierte Mischkulturen ungeeignet (EFSA 2012). Die in den Kulturen vertretenen Spezies sind zwar bekannt, nicht aber die Stämme und ihr jeweiliger Anteil. Um dieses Problem zu umgehen, wurde bei Agroscope eine Methode entwickelt, die basierend auf isothermaler Mikrokolorimetrie die Messung der MHK erlaubt (von Ah et

Tab. 3 | Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Untersuchungen bei den sechs Stämmen mit einer erworbenen Antibiotika-Resistenz

Untersuchungsmethode für die Bestimmung der Antibiotika-Resistenz	Untersuchte Stämme		
	FAM-17868	FAM-23213 FAM-23214 FAM-23215 FAM-23220	FAM-23218
Phänotypisch (minimale Hemm-konzentration in mg/L)	Nicht bestimmt	Clindamycin > 4 Erythromycin > 8 Tetracyclin > 16	Tetracyclin > 16
Genotypisch mittels ResFinder	Macrolid-Resistenz <i>erm</i> (B)	Macrolid-Resistenz <i>erm</i> (B) Tetracyclin-resistenz <i>tet</i> (M)	Tetracyclin-Resistenz <i>tet</i> (S)
Genotypisch mittels ARG-ANNOT	Macrolid-Resistenz <i>erm</i> (B)	Macrolid-Resistenz <i>erm</i> (B) Tetracyclin-Resistenz <i>tet</i> (M)	Tetracyclin-Resistenz <i>tet</i> (S)

al. 2018). Eine Metagenom-Analyse einer ausgewählten 16S-Region kann die Sicherheit von nicht-definierten Kulturen weiter erhöhen, da damit zusätzliche Spezies erkannt werden können und zudem im Metagenom nach bekannten Antibiotika-Resistenz-Genen gesucht werden kann.

Klärungsbedarf bei ungenau definierten Schwellenwerten

Bei homofermentativen Laktobazillen stammen die verfügbaren Daten zumeist von *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, einer Subspezies, die bei der Joghurtherstellung eingesetzt wird. Bei der Herstellung von Käse kommt hingegen vor allem die Subspezies *L. delbrueckii subsp. lactis* zum Einsatz. Bei internen Studien mit Stämmen von *L. delbrueckii subsp. lactis* wiesen 80 % der Stämme MHK-Werte auf, welche die Schwellenwerte für Kanamycin gemäss den EFSA-Vorgaben überschritten (bisher unveröffentlichte Daten von Agroscope). Auch viele Stämme von *Leuconostoc* weisen für Kanamycin MHK-Werte über dem Schwellenwert auf. Da kein bekanntes Resistenzgen im Genom der getesteten Stämme nachgewiesen werden kann und es sehr unwahrscheinlich ist, dass so viele verschiedene Stämme bereits vor vielen Jahrzehnten ein unbekanntes Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum erworben haben, dürfte es sich um einen wegen fehlenden Daten ungenau definierten Schwellenwert handeln. Die EFSA sollte den Schwellenwert für *L. delbrueckii ssp.* und *Leuconostoc spp.* von 16 mg/L überprüfen. Agroscope wird die Ergebnisse publizieren und will damit zur Meinungsbildung beitragen. Da nicht alle Stämme diese Eigenschaft aufweisen, kann nicht von einer intrinsischen Resistenz gesprochen werden.

Eine vergleichbare Situation gibt es bei *Pediococcus acidilactici*. Bei dieser Spezies weisen viele Stämme für Tetracyclin MHK-Werte über dem Schwellenwert auf, ohne dass ein Resistenz-Gen nachgewiesen werden kann. Lüdin *et al.* (2018) schlagen deshalb vor, den Schwellenwert von 8 mg/L zu überprüfen.

Schlussfolgerungen

Die Stämme, die Agroscope für die Liebefelder Kulturen auswählt, sind aus heutiger Sicht im Allgemeinen sehr sicher. Sie haben keine übertragbaren Antibiotika-Resistenzgene, keine kritischen Virulenzfaktoren und bilden keine biogenen Amine. Dies ist auch dem Umstand zu verdanken, dass viele Stämme bereits zu einer Zeit isoliert wurden, als noch weniger Antibiotika eingesetzt wurden oder die Resistenzen sich noch nicht ausbreiten konnten. Viele Stämme stammen zudem aus Kulturen mit einer «long history of safe use».

Bei der Analyse des Vollgenoms kann nur nach bekannten Resistenz-Genen gesucht werden. Ausserdem gibt es zahlreiche Gene, deren Funktion nie eindeutig bestätigt wurde. Dies sorgt für Unklarheiten und erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Es bedingt auch, dass die Analysen laufend aktualisiert werden.

Die Stämme, die in Oberflächenkulturen für die Schimmel- oder Schmierereifung von Käse eingesetzt werden, haben zwar auch eine «long history of safe use», nicht alle haben jedoch den QPS-Status. Auch wenn die Käseschmiere in der Regel vor dem Verzehr weggeschnitten wird, gibt es hier noch einige offene Fragen, die in den nächsten Jahren geklärt werden sollen. ■

Riassunto**Testata la sicurezza delle colture di Liebefeld**

I ceppi microbici utilizzati da Agroscope per i test pratici e che, in caso di successo, diventano poi parte integrante delle colture miste definite, devono attestare una sicurezza elevata. Per questo sono stati testati 164 ceppi di batteri lattici della raccolta di ceppi di Agroscope per analizzare la sicurezza per quanto concerne le resistenze trasmissibili agli antibiotici, la formazione di ammine biogene e la presenza di fattori di virulenza. Solo sei ceppi hanno dovuto essere esclusi in quanto presentavano una o più resistenze trasmissibili agli antibiotici. Questi ceppi sono stati isolati solo pochi anni fa. Tuttavia, la maggior parte dei ceppi della raccolta sono stati isolati da diversi decenni, in un momento in cui le resistenze non si erano ancora diffuse. La raccolta dei ceppi ha un valore inestimabile anche per l'elevata biodiversità e il grande numero di ceppi.

Summary**Safety clearances for the Liebefeld cultures**

The microbial strains that Agroscope uses for practical trials and which, if successful, subsequently become part of a defined mixed culture, must demonstrate a high level of safety. With this end in view, 186 strains of lactic acid bacteria from the Agroscope Culture Collection were tested for transferable antibiotic resistances, the formation of biogenic amines, and the presence of virulence factors. Only six strains had one or more transferable antibiotic resistances, and thus had to be ruled out. These strains were only isolated a few years ago. By contrast, the majority of strains from the Culture Collection were isolated several decades ago, at a time when resistances were probably not yet spread to such a large extent as they are today. The Culture Collection is also of inestimable value owing to its high biodiversity and the large number of strains it contains.

Key words: microbial cultures, transferable antibiotic resistances, biogenic amines, virulence factors.

Literatur

- Billot-Klein D., Gutmann L., Sable S., Guittet E. & Van Heijenoort J., 1994. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type enterococcus D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *Journal of Bacteriology* **176** (8), 2398–2405.
- Bourdichon F., Alper I., Bibiloni R., Dubois A., Laulund S., Miks M., Morelli L., Zuliani V. & Yao, S., 2018. Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products. *Bulletin IDF-FIL* **495**, 1–51.
- Chen L., Zheng D., Liu B., Yang J. & Jin Q., 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on. *Nucleic Acids Research*. **44** (D1) D694–D697. Zugang: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* **10** (6), 2740. Zugang: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>.
- Leuschner R. G. K., Robinson T. P., Hugas M., Cocconcelli P. S., Richard-Forget F., Klein G., Licht T. R., Nguyen-The C., Querol A., Richardson M., Suarez J. E., Thrane U., Vlák J. M. & von Wright A., 2010. Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology* **21** (9), 425–435. Zugang: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.003>.
- Lüdin P., Roetschi A., Wuethrich D., Bruggmann R., Berthoud H. & Shani N., 2018. Update on tetracycline susceptibility of *Pediococcus acidilactici* based on strains isolated from swiss cheese and whey. *Journal of Food Protection* **81** (10), 1582–1589. Zugang: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-160>.
- Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies R., Girones R., Herman L., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Nørrung B., Robertson L., Ru G., Sanaa M., Simmons M., Skandamis P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlström H., Cocconcelli P.S., Klein G., Prieto Maradona M., Querol A., Peixe L., Suarez J.E., Sundh I., Vlák J.M., Aguilera-Gómez M., Barizzone F., Brozzi R., Correia S., Heng L., Istace F., Lythgo C., & Fernández Escamez P.S., 2017. Scientific opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal* **15** (3), 4664. Zugang: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4664>.
- von Ah, U., Shani N., Chollet M., Solokhina A. & Braissant O., 2018. Measuring antibiotic resistance in mixed cultures: Isothermal microcalorimetry as a novel analytical tool. *International Dairy Journal* **77**, 73–79. Zugang: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.09.007>.
- von Wintersdorff C. J. H., Penders J., van Niekerk J. M., Mills N. D., Majumder S., van Alphen L. B., Savelkoul P. H. M., & Wolffs P. F. G., 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology* **7** (173) 1–10. Zugang: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
- WHO, 2018. Antimicrobial resistance. *Fact sheet WHO*. Zugang: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [13.3.2019].
- Zankari E., Hasman H., Sommer Kaas R., Seyfarth A.M., Agersø Y., Lund O., Voldby Larsen & Aarestrup F.M., 2013. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68** (4) 771–777. Zugang: <https://doi.org/10.1093/jac/dks496>.