

Anpassung mikrobiologischer Qualitätsbestimmung bei Rohmilch an moderne Produktionsbedingungen durch Entwicklung und Integration innovativer Schnellmethoden (NextMilQ) FKZ 281A105716

Teilprojekt Max Rubner-Institut, Kiel

AP 2: Isothermale Amplifikation (LAMP) als sensitive und innovative Schnellmethode zum Nachweis von *Bacillus sporothermodurans*

Gregor Fiedler, Jan Kabisch, Charles M.A.P. Franz, Christina Böhnlein

Hintergrund

Die Globalisierung des Markts für Milch und Milchprodukte und damit der weltweite Transport ohne Qualitätsminderungen wurde vor allem durch verbesserte Produktionsbedingungen ermöglicht. Thermische Entkeimungsschritte sind die üblichen Methoden zur Herstellung mikrobiologisch stabiler Milch. Häufig werden Verfahren von der traditionellen Pasteurisierung bis zur Ultrahoherhitzung (UHT) angewendet.

Hitzebeständige Sporenbildner, insbesondere Mitglieder der Familie der *Bacillaceae*, können diese Prozesse überleben. Eine Auskeimung der Sporen und nachfolgende Vermehrung der Bakterien führt dann zum Produktverderb. Finanzielle Verluste für Unternehmen und eine gesteigerte Lebensmittel- und Ressourcenverschwendung sind daher direkte Folgen der Sporenverunreinigung von Milch.

Ein schneller Nachweis ist besonders für die hoch hitzebeständigen Sporen von *Bacillus sporothermodurans* wichtig. Kulturelle Methoden scheitern in dieser Hinsicht oft an den langen Inkubationszeiten von 48 h und der anschließenden Identifizierung dieser Bakterien. Für den Schnellnachweis von *Bacillus sporothermodurans* in Milch wurde daher eine *Loop mediated isothermal amplification* (LAMP) entwickelt und evaluiert.



DNA

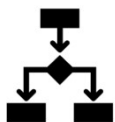
Isolation aus Milch



Quelle: Max Rubner-Institut



Nachweis durch
LAMP Reaktion
innerhalb 20
Minuten



Ergebnis und
Reaktion

Methode

- Genomsequenzierung von 32 *Bacillus sporothermodurans* Stämmen
- *In silico* Analyse der Genome und Primerdesign für eine *Loop mediated isothermal amplification* (LAMP)
- Optimierung der Reaktionsbedingungen
- Bestimmung der Selektivität und Sensitivität der LAMP Reaktion inklusive Positivkontrollen (n=32) und Negativkontrollen (n=17)

Ergebnisse

- Einfache Durchführung zur selektiven Detektion von *Bacillus sporothermodurans* DNA innerhalb von 20 Minuten (Abb. 1)
- Keine falsch positive Detektion anderer Bakterienspezies
- sehr gute Sensitivität von 10-100 Genomen je Reaktion als untere Nachweisgrenze
- Erfolgreiche Anpassung an die Matrix Milch
- Flexible Analyse möglich durch mobiles Detektionsgerät (Abb. 2)

Ausblick

- Validierung des Nachweissystems (AP 3)

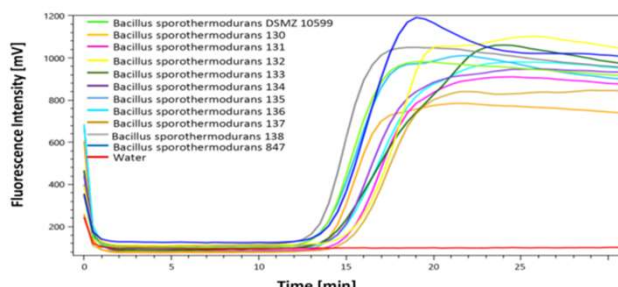


Abb. 1: Nachweis von *B. sporothermodurans* durch LAMP (100 Genome je Reaktion)

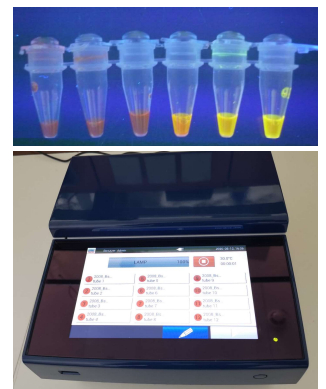


Abb. 2: LAMP-Nachweis unter UV-Licht (oben); (unten) mobiles Fluoreszenzmessgerät mit Thermoelement (ESQuant TS2, Qiagen®)