

**Aus dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Universität zu Köln
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. dent. M. J. Noack**

**Untersuchung zur Identifizierung von biochemisch klassifizierten Keimen der
Mikroflora tiefer kariöser Läsionen aus Milchzähnen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Hendrik Felke

aus Halle (Saale)

promoviert am 30. Januar 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln
2013

Druck: Sprintout Digitaldruck GmbH, Grunewaldstr.18, 10823 Berlin

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. dent. M. Wicht

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. H. Seifert

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Privatdozent Dr. Michael Wicht

Dipl.-Biol. Isaia Sotiriadou

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen.

Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 08.08.2012

Hendrik Felke

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden mikrobiologischen Untersuchungen und Auswertungen sind von mir mit Unterstützung von Herrn Privatdozent Dr. M. Wicht, Frau Dipl.-Biol. I. Sotiriadou sowie Herrn Privatdozent Dr. G. Plum aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene und der medizinisch-technischen Assistentin Frau B. Rauschenberger durchgeführt worden.

Danksagung

Für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gelder zur Durchführung meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. M. J. Noack.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. M. Wicht für die freundliche Überlassung des Themas und für seine Unterstützung, Förderung und Betreuung.

Zum anderen möchte ich mich bei Frau I. Sotiriadou und Frau B. Rauschenberger für ihre freundliche Unterstützung, Hilfestellung und Einweisungen in die verschiedenen mikrobiologischen Arbeitstechniken bedanken.

Großer Dank gilt meiner Familie, die durch ihren Zuspruch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Orale Keime	3
2.2 Bakterien des kariösen Dentins	4
2.3 Laktobazillen	7
2.3.1 Anzucht von Laktobazillen	9
2.4 Actinobacteria	9
2.5 Bifidobakterien	10
2.6 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse im oralen Mikrobiom	10
2.7 Fragestellung	12
3 Material und Methode	13
3.1 Studiendesign	13
3.2 Einverständniserklärung	14
3.3 Gewinnung kariöser Dentinproben	14
3.3.1 Der selektive Nachweis von Laktobazillen	15
3.4 Kultivierung der Stämme und phänotypische Beschreibung	15
3.5 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse	17
3.5.1 Überprüfung der PCR Produkte durch Gelelektrophorese	18
3.5.2 Aufreinigung des PCR Produktes	19
3.5.3 Darstellung der Nukleinsequenzen und Auswertung	19
3.5.4 Gen-Datenbanken Blast / PBIL / RDP-II	20
4 Ergebnisse	22
4.1 Keimflora der Dentinkaries	22
4.1.1 Laktobazillus Arten	23
4.1.2 Actinobacteria	25
4.1.3 Streptococcus sobrinus	26
4.2 Artenvielfalt der Isolate	26

4.3	Auswertung der verschiedenen Datenbanken	27
5	Diskussion	29
5.1	Diskussion der Methode	29
5.2	Konventionelle Anzucht und Nachweis von Laktobazillen	29
5.3	Identifizierung durch 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse	31
5.4	Basenanzahl, Similarity, Gen-Datenbanken	33
5.5	Diskussion der Ergebnisse	35
5.6	Schlussfolgerungen	38
6	Zusammenfassung	39
7	Literaturverzeichnis	41
8	Anhang	49
8.1	Materialliste	49
8.2	Tabellen der Ergebnisse	50
9	Lebenslauf	54

Abkürzungsverzeichnis

A.	Aktinomyceten
B.	Bifidobacterium
L.	Lactobacillus
O.	Olsenella
P.	Parascardovia
S.	Streptococcus
Sc.	Scardovia
T.	Treponema
PCR	Polymerase Chain Reaction
RDP-II	Ribosomal Database Project
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
PBIL	Pole Bio-Informatique Lyonnais
Similarity	Gleichheit von Sequenzen gegenüber Referenzsequenzen in Gen-Datenbanken

1 Einleitung

Karies, Parodontitis und andere Infektionen werden unter anderem durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften verursacht und nicht durch einen einzigen Erreger [46].

Diese Gemeinschaften bestehen aus 500 - 700 verschiedenen oralen Bakterienarten, von denen 82% gut kultivierbar und identifizierbar sind [29, 83, 84].

Untersuchungen mit diesen Mikroorganismen haben gezeigt, dass Erkrankungen wie Karies, Parodontitis und endodontische Infektionen zu einer Reihe von systemischen Erkrankungen führen können, unter anderem zu Herz-Kreislauserkrankungen, bakterieller Endokarditis, Diabetes mellitus, Schlaganfall, Osteomyelitis bei Kindern, Frühgeburt und Pneumonie [3, 6, 11, 30, 36, 49, 50, 78, 89, 110].

Für die Erkenntnis mikrobakterieller Zusammenhänge von oralen und systemischen Erkrankungen werden für die Identifizierung oraler Bakterien, die mit systemischen Erkrankungen assoziiert werden, 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse basierte Methoden als zuverlässiges Werkzeug genutzt [5, 38, 59, 107, 112].

Die eindeutigen Ergebnisse ermöglichen die Erstellung von bakteriellen Profilen, um bei Menschen mit dem Risiko einer systemischen Erkrankung, potentiell pathogene Profile rechtzeitig zu erkennen und dadurch schwerwiegende Krankheiten zu verhindern [102, 107].

Die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse Methode ist wesentlich genauer und spezifischer in der Identifikation von Mikroorganismen und neuen Phylotypen als die konventionelle Methode, welche die Anzucht auf einem Selektivmedium, die Durchführung von biochemischen Tests und die mikroskopische Beurteilung der Kolonien beinhaltet.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse beider Methoden sind bei identischen Bakterien nur 55% übereinstimmend identifiziert worden [5]. Durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse ist eine komplexere Vielfalt an pathogenen Keimen in Karies festgestellt worden [7, 25].

Mutans-Streptokokken und Laktobazillen werden als Hauptbakterien bei tiefen kariösen Läsionen beschrieben [81]. In diesen Läsionen sind etwa 30% der Gesamtflora *S. mutans* [98]. Eine hohe Anzahl von *S. mutans* wird traditionell mit hoher Kariesaktivität verbunden. Doch kann bei Patienten trotz deutlich ausgeprägter Symptome von Karies der Nachweis von *S. mutans* unterbleiben [1, 14, 38]. Es wird beschrieben, dass Laktobazillen nur bei Patienten mit fortgeschrittener Karies festgestellt und selten an gesunden Zähnen diagnostiziert werden. Selbst ohne die Anwesenheit von

Laktobazillen und *S. mutans* kann es zu einer Demineralisierung der Zahnhartsubstanz kommen [26]. In tiefen kariösen Läsionen befindet sich ein dynamisch mikrobielles Ökosystem, in dem viele verschiedene Bakterien mit unterschiedlichen phänotypischen und genotypischen Eigenschaften nebeneinander existieren [17]. Auf Grund neuer mikrobiologischer Untersuchungen wurden kariesassoziierte Bakterien neu bewertet. Bakterien wie Laktobazillen, Bifidobakterien, Propionibakterien, Aktinobakterien, *S. mutans* und andere Streptokokken existieren in diesen Läsionen [18, 17, 98]. Diese Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, Säuren aus zuckerhaltigen Lebensmitteln zu produzieren und wirken demineralisierend auf die Zahnhartsubstanz. Wenn die Bakterien nur selten zuckerhaltige Substrate erhalten, liegt das Gleichgewicht des mikrobiellen Ökosystems auf der Seite der Bifidobakterien, Propionibakterien, Aktinobakterien und anderer Streptokokken. In einer stark aktiven kariösen Läsion bei hoher Substratzufuhr beträgt der durchschnittliche pH-Wert < 5 [15]. Bei diesem pH-Wert können *S. mutans* und Laktobazillen besser existieren als Bifidobakterien, Propionibakterien und Aktinobakterien, da diese Ihre Überlebensfähigkeit verlieren und dadurch verdrängt werden. Es kommt zu einer Verschiebung der Zusammensetzung der Mikroflora in tiefen kariösen Läsionen bei hoher Substratzufuhr durch eine säureinduzierte Anpassung der säureproduzierenden Bakterien. Deshalb werden *S. mutans* und Laktobazillen am häufigsten aus tiefen kariösen Läsionen isoliert, da diese an ein stark saures Milieu besser angepasst sind [15, 69, 98].

Die genaue Identifizierung dieses Keimspektrums durch 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse führt zu einem besseren Verständnis dieses mikrobiellen Ökosystems.

2 Literaturübersicht

2.1 Orale Keime

Mikroorganismen, die in der menschlichen Mundhöhle isoliert, beschrieben und in der oralen Mikroflora identifiziert wurden, werden als orales Mikrobiom bezeichnet. Dies ist eine ökologische Gemeinschaft zusammenlebender, symbiotischer und pathogener Mikroorganismen [29, 58].

In dem oralen Mikrobiom existieren zwischen 500 und 700 verschiedene Arten [29]. In einer Untersuchung mit 197.600 Sequenzen aus der Mundhöhle wird beschrieben, dass das orale Mikrobiom aus ca. 19.000 Phylotypen besteht. In dieser Studie wird nicht beachtet, dass viele dieser Phylotypen eine sehr hohe genetische Ähnlichkeit (Similarity: Gleichheit von Sequenzen gegenüber Referenzsequenzen in Gen-Datenbanken) haben [53].

Es wird eine Similarity von >99% und besser noch 99,5% empfohlen, weil eine Abweichung von >0,5% eine neue Art darstellen kann [45, 82, 107].

Weitere Studien beschreiben, dass 18% bis 50% an Phylotypen nicht kultivierbar und anzüchtbar sind [29, 83, 84].

Eine Feststellung der konkreten Anzahl von Phylotypen in dem oralen Mikrobiom ist derzeit noch nicht möglich.

Einer der ersten Keime, der sich unmittelbar nach der Geburt im oralen Bereich des Neugeborenen auf der Zunge und den Mundschleimhäuten ansiedelt, ist *S. salivarius* [55]. Mit dem Durchbruch der Milchzähne kommt es zu einer Nischenbildung, in der der Sauerstoffpartialdruck absinkt und somit potentielle Lebensräume für weitere Mikroorganismen wie Actinobacteria, Bacteroidaceae, Candida, Fusobakterien, Laktobazillen, Leptotrichia, Rothiabakterien, Spirochäten, Streptokokken und Veillonella in der Mundhöhle geschaffen werden [15].

Arten von Actinomyces, Bifidobakterien, Veillonella, Laktobazillen und weiteren Streptokokken werden mit Karies assoziiert [1].

Mutans-Streptokokken besitzen die Fähigkeit, durch Bildung extrazellulärer Polysaccharide an Zahnoberflächen zu kolonisieren, eine Absenkung des pH-Wertes und eine Progression der Karies zu bewirken. *S. sanguinis* kann in mikrobakteriellen Kolonien durch die Erzeugung von Ammoniak den pH-Wert positiv regulieren.

Streptokokken wie *S. parasanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* gelten als Mikroorganismen eines kariesfreien Gebisses. [1, 7, 21].

In Zahnfleischtaschen wurden über 415 Bakterienarten in subgingivaler Plaque identifiziert. Vorherrschende Arten in Zahnfleischtaschen sind *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* und *Treponema denticola*. Von der Gattung *Treponema* wurden allein 60 verschiedene Arten vorgefunden [1].

Kinder mit Karies haben eine höhere Anzahl und eine größere Vielfalt an Mikroorganismen als Kinder ohne Karies [7].

2.2 Bakterien des kariösen Dentins

Karies ist eine chronische Erkrankung, die sich aus einem anfänglichen Zahnschmelzabbau und die anschließende Besiedlung des darunter liegenden Dentins entwickelt, und bei anhaltender Progression erhalten die Mikroorganismen in sehr späten Stadien Zugang zu der Zahnpulpa. Ein Fortschreiten der Läsion kann zur Nekrose des Pulpagewebes führen und durch toxische Einwirkung der Keime eine immunpathologische Antwort hinterlassen. Dabei gelten Streptokokken wie *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae* und *S. sanguinis* als Keime, die primär für den Zahnschmelzabbau verantwortlich sind. Laktobazillen wie *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* gelten als sekundäre Eindringlinge einer bestehenden Läsion. Tiefe Karies und die weitere Kariesprogression werden mit Actinobacteria wie *Bifidobacterium dentium* und *Scardovia wiggsiae* in Verbindung gebracht [7, 22, 64, 99].

Es wird angenommen, dass die Vielfalt der Mikroflora in der Karies mit fortschreitender Progression abnimmt sowie im Speichel und der Plaque die Vielfalt der Mikroflora bei verstärkter Kariesaktivität zunimmt. Der Anteil pathogen wirkender Mikroorganismen steigt stark an. Diese Veränderung der Mikroflora ist bei Kindern und Erwachsenen ähnlich [7, 9, 18, 26, 59, 60, 69, 112]. In bleibenden Zähnen wird von einer größeren Vielfalt oraler Keime ausgegangen [1].

Während Bakterien wie Streptokokken an der Oberfläche Glykoproteine aus dem Speichel verstoffwechseln können, sind Bakterien in tiefen Läsionen langsam wachsende Anaerobier mit proteolytischen Eigenschaften und existieren durch Nährstoffe aus der Diffusion des dentinalen Tubulussystems [42]. Schon 1979 wurde angenommen, dass in tiefer Karies neben *S. mutans* auch Laktobazillus-, Aktinomyces-

und Veillonella-Arten vorherrschen [33]. Laktobazillen können antimikrobielle Eigenschaften ausbilden und damit das Wachstum von *S. mutans* hemmen. Unklar ist, was dazu führt, ob *S. mutans* oder Laktobazillen die dominierenden Bakterien in der späten Phase der Karies darstellen. Explorative Studien konnten keine Unterschiede bei schwerer Karies durch Fluoridexpositionen, bei Ernährungsgewohnheiten, nach Antibiotikaeinnahmen, durch Rauchen, nach Geschlecht oder Rasse feststellen [16, 18, 63, 90]. Eine Studie an Milchzähnen und bleibenden Zähnen hat ergeben, dass Laktobazillen, Bifidobakterien, Veillonella und Propionibakterien eine wichtigere Rolle in der Kariesprogression spielen als *S. mutans* [1].

Im oralen Mikrobiom wurde das Propionibakterium, das zu den Actinobacteria zählt, ausschließlich in tiefer Karies nachgewiesen [85].

In Studien tiefer Dentinkaries, in denen die Kombination von biochemischen Analysen und der 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse angewendet wurde, sind durch die Identifikation der verschiedenen Keimspektren kariöser Läsionen teilweise bis zu 91,9% Laktobazillen gefunden worden, aber auch Läsionen ohne Laktobazillenbeteiligung. In den verschiedenen Läsionen wurden viele grampositive und anaerobe stäbchenförmige Bakterien nachgewiesen. Des Weiteren wurden in allen Zähnen mit tiefen Läsionen geringe bis nicht vorhandene Vorkommen von *S. mutans* nachgewiesen [39, 38].

Die Wahrscheinlichkeit, dass kariesaktive Personen hohe Isolationsfrequenzen von *S. mutans* oder Laktobazillen haben, variiert zwischen 44% bis 71% [55].

Die am häufigsten nachgewiesenen Laktobazillen bei Erwachsenen und Kindern sind *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum* und *L. gasseri* [7, 13, 38, 54, 68, 69, 75, 85, 100, 112]. In Milchzahnstudien waren die meist nachgewiesenen Laktobazillen *L. fermentum* und *L. gasseri*. Es wurden auch *L. paracasei*, *L. casei* und *L. rhamnosus* isoliert [7, 38, 54, 68, 100]. In tiefen kariösen Läsionen erwachsener Probanden ist *L. rhamnosus* unter den am häufigsten isolierten Arten. *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. casei* wurden ebenfalls nachgewiesen [13, 69, 75, 85, 112]. Das Hauptkeimspektrum ist bei Erwachsenen und Kindern vergleichbar. In beiden Gruppen wurden Actinobacteria im kariösen Dentin identifiziert, die wie Laktobazillen auf Rogosa-Agar wachsen können. Hauptvertreter der Actinobacteria sind *Bifidobacterium dentium*, *Parascardovia dentikolens*, *Scardovia inopinata* und die Gattung Propionibakterien [7, 38, 67, 75, 85, 100].

Die folgende Tabelle wurde auf Grundlage der genutzten Studien erstellt und zeigt einen Auszug des nachgewiesenen Hauptkeimspektrums innerhalb der Laktobazillen und Aktinobakterien tiefer kariöser Läsionen.

13	38	67	69	75	85	112	Erwachsene	Bakterium	Kinder	07	38	54	67	68	100
							n=		n=						
+			+	+	+	+	5	<i>L.rhamnosus</i>	2			+		+	
	+		+		+		3	<i>L.paracasei</i>	3		+	+			+
			+			+	2	<i>L.fermentum</i>	3	+				+	+
	+				+	+	3	<i>L. casei</i>	2		+			+	
	+			+		+	2	<i>L. gasseri</i>	3		+	+			+
								<i>L. buchneri</i>	1					+	
								<i>L. alimentarius</i>	1			+			
			+				1	<i>L. plantarum</i>							
						+	1	<i>L. oris</i>							
						+	1	<i>L. salivarius</i>							
						+	1	<i>L. vaginalis</i>							
	+			+			2	<i>L. johnsonii</i>			+				
		+					1	<i>B. dentium</i>	3	+			+		+
	+			+	+		3	<i>Propionibakterium</i>	1		+				
		+					1	<i>P. denticolens</i>	2				+		+
		+					1	<i>S. inopinata</i>	1				+		
								<i>Veillonella</i>	1	+					
				+			1	<i>O. profusa</i>							
								<i>Sc. wiggisiae</i>	1						+
								<i>Lachnospiraceae</i>							+
			+				1	<i>Prevotella</i>							
+							1	<i>A. naeslundii</i>							
		+						<i>B. longum</i>							
		+						<i>B. breve</i>							
								<i>S. sobrinus</i>	2	+					+

Tab. 1: Die Tabelle stellt nachgewiesene Bakterien aus verschiedenen Studien dar. In der ersten Zeile ist jede Studie mit einer Nummer gekennzeichnet. Diese Nummer ist im Literaturverzeichnis ausgewiesen. Das Plus kennzeichnet den in dieser Studie vorgefundenen fakultativ anaeroben Keim. Die Tabelle führt auf der linken Seite Studien an Erwachsenen und auf der rechten Seite Studien mit Kindern auf. Die Häufigkeit der in den Studien gefundenen Keime ist in den Spalten Erwachsene und Kinder unter n= abzulesen.

Der auch auf Rogosa-Agar wachsende *S. sobrinus* wurde vorwiegend bei Kindern sowohl mit als auch ohne Karies festgestellt. *S. sobrinus* hat die Eigenschaft Laktat zu produzieren [7, 48]. *Veillonella*, die in diesen Studien gefunden wurde, kann Milchsäure in Propion und Essigsäure verstoffwechseln. Damit besitzen Bakterien der Gattung *Veillonella* die Fähigkeit, produzierte Milchsäure abzuschwächen und so die Säure produzierenden Bakterien zu schützen [7, 48].

Die aktuellen Studien zeigen die derzeitig am meisten identifizierte Vielfalt der fakultativ anaeroben Mikroorganismen in tiefer Karies. Aufgrund der differenziellen Vorgehensweisen in den Studien sind eindeutig abschließende Schlussfolgerungen über die Vielfalt der Mikroorganismen nicht möglich.

Hervorzuheben ist die entscheidende Rolle in der Etablierung und Entwicklung tiefer kariöser Läsionen von Actinobacteria [1, 7, 13, 38, 54, 67, 68, 69, 75, 85, 100, 112].

2.3 Laktobazillen

Die Gattung der Laktobazillen umfasst fast 100 Arten und besitzt eine große Vielfalt an genetischen Eigenschaften. Im oralen Mikrobiom besitzen diese Bakterien bei Kariesprogressionen einen hohen Stellenwert [112]. Es gibt relativ wenige Informationen über diese Bakterien [101].

Laktobazillen sind grampositive, stäbchenförmige, vancomycinresistente Bakterien mit einer negativen Katalase-Reaktion. Sie gelten als sekundäre Eindringlinge einer bestehenden Läsion, sind starke Säureproduzenten und besitzen eine niedrige pH-Toleranz [101].

Es wurden ihnen die Eigenschaften der Anbindung an menschliche Thrombozyten, Kollagen, Fibrinogen und Fibronectin sowie die Verbindung zu infektiöser Endokarditis nachgewiesen [41].

L. rhamnosus, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum* und *L. gasseri* gelten als Hauptvertreter der Laktobazillen im oralen Mikrobiom [7, 69, 112]. Die Anzahl der Laktobazillen steigt mit zunehmender Karies an, sie verdrängen andere Bakterien und sind in ihren Eigenschaften sehr ähnlich. Daher werden sie oft in einer Gruppe als Ganzes erfasst und selten in Studien differenziert [7].

L. rhamnosus zählt zu den fakultativ heterofermentativen Laktobazillen und ist neben Karies häufig im Gastrointestinaltrakt von gesunden Erwachsenen isoliert worden. Er unterscheidet sich in 27% seiner Protein kodierenden Gene zu *L. casei* und hat eine sehr ähnliche Gen-Organisation wie *L. plantarum* [74]. *L. rhamnosus* wird auch mit der Produktion von Bacteriocinen in Verbindung gebracht, welche Toxine sind, die das Wachstum anderer Bakterien inhibieren können [74]. Außerdem besitzt er die Fähigkeit, sich an Kollagen Typ 1 und 2 anbinden zu können [41].

L. gasseri wurde ebenfalls neben Karies im Gastrointestinaltrakt von gesunden Erwachsenen nachgewiesen und zählt zu den grampositiven und fakultativ anaeroben

Bakterien [94]. Der Zusammenhang zwischen Laktobazillen und Karies wurde schon 1939 von Bunting und Russel (ADA, 1939) durch einen erhöhten Anteil von *L. acidophilus* bei Personen mit verstärkter Kariesaktivität bewiesen [4]. Die ersten Laktobazillen aus kariösem Dentin wurden sogar schon 1924 identifiziert [19].

Die Laktobazillen der oralen Mikroflora werden in drei nach ihren Fermentationseigenschaften identifizierten Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe besteht aus obligat homofermentativen Arten wie *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. pseudoplanatarum* und *L. paracasei*. Diese obligat homofermentativen Arten spalten Hexosen fast ausschließlich zu Milchsäure, können aber auch die Fähigkeit besitzen, diese zu Essigsäure zu verstoffwechseln. Die Gruppe der fakultativ homofermentativen Arten können zusätzlich auch Pentosen vergären. Zu ihnen gehören *L. casei* und *L. planetarum*. Heterofermentative Arten wie *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* und *L. cellobiosus* besitzen die Fähigkeit Hexosen zu Milchsäure, Äthylalkohol und Kohlendioxid zu fermentieren. Des Weiteren können Pentosen zu Milchsäure und Essigsäure fermentiert werden [8].

Es bestehen weitere Einteilungen in phylogenetisch eng verwandte Gruppen, zum Beispiel der *L. casei* Gruppe mit den Vertretern *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*. Die Bakterien dieser Gruppe gelten als typische Keime tiefer Läsionen und sind auf Grund Ihrer großen phylogenetischen Verwandtschaft oft nur als Gruppe mit *L. casei* durch konventionelle Nachweismethoden identifiziert worden [18, 33, 38, 85, 100, 112]. Durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse ist es möglich, auch phylogenetisch eng verwandte Bakterien zu unterscheiden. Eine weitere phylogenetische Gruppe stellt die *L. reuteri* Gruppe dar, zu denen unter anderem *L. reuteri*, *L. oralis* und *L. vaginalis* gezählt werden. Vertreter dieser Gruppe wurden auch in tiefen kariösen Läsionen nachgewiesen und im vaginalen Epithel gesunder Frauen vorgefunden [44, 112].

Neben der Besiedelung des Gastrointestinaltraktes von Menschen und dem Urogenitaldarmtrakt der Frau spielen sie eine immer größere Rolle als Probiotikum für die Förderung der allgemeinen Gesundheit und stellen einen enormen Wert in der Gärung und Konservierung von verschiedenen Lebensmitteln dar [12].

2.3.1 Anzucht von Laktobazillen

Der in dieser Studie verwendete Rogosa-Agar, der vor 60 Jahren für ein erweitertes Spektrum von Laktobazillen entwickelt wurde, ist auch in neueren Studien als Medium für die spezifische Anzucht von Laktobazillen bestätigt worden [80, 99]. Dabei ist das Risiko des Wachstums anderer auf einem sauren Boden wachsenden Bakterien, z.B. *S. sobrinus* bekannt. Die morphologische Unterscheidung der Kolonien ist jedoch sehr schwierig. Durch einen pH-Wert von 5,4 wird in der Regel das Wachstum der Begleitflora verhindert und begründet so das selektive Wirkprinzip des Rogosa Agar für die Anzucht von stark säuretoleranten Bakterien. Dieser Agar enthält verschiedene Salze, eine hohe Azetatkonzentration und besitzt zusätzlich eine günstige Oberflächenspannung, welche das Ausstreichen von Proben auf diesen Agar erleichtert. Die nachzuweisenden Bakterien werden mittels der Drei-Ösen-Ausstrichtechnik auf einer Rogosa-Platte bei 37°C unter anaeroben Bedingungen für 3 Tage inkubiert. Laktobazillen wachsen in Form unscheinbarer, runder, weißlicher oder transparenter Kolonien, die leicht ausgezählt werden können [4, 80, 87, 99].

2.4 Actinobacteria

Actinobacteria gehört zu der Gruppe der grampositiven, stäbchenförmigen Bakterien. Dieser Stamm teilt sich in mehrere Unterklassen auf. Die Unterklasse *Coriobacteridae* wird weiter in die Ordnung der *Coriobacteriales* und die Unterklasse *Actinobacteridae* in die Ordnungen *Bifidobacteriales* und *Actinomycetales* differenziert. Diese Bakterien spielen im oralen Mikrobiom eine besondere Rolle.

Zu den *Actinomycetales* werden die Gattungen *Actinomyceten*, *Rothia*, *Kocuria*, *Arsenicoccus*, *Microbakterium*, *Propionibakterium*, *Mycobakterium*, *Dietzia*, *Turicella* und *Corynebakterium* gezählt. Die *Bifidobacteriales* werden in die Gattungen *Bifidobakterium*, *Gardnerella*, *Scardovia* und *Parascardovia* aufgeteilt.

Zur Unterklasse der *Coriobacteridae* werden die Gattungen *Atobium*, *Cryptobakterium*, *Eggerthella*, *Olsenella* und *Slackia* eingeordnet [29].

Einige Gattungen der Actinobacteria wie *Parascardovia*, *Propionibakterium*, *Bifidobakterium*, *Scardovia* und *Olsenella* sind in verschiedenen Studien in Zusammenhang mit Erkrankungen wie Karies, Parodontitis und endodontischen Infektionen gebracht, als auch im Speichel der untersuchten Personen nachgewiesen

worden [7, 10, 22, 42, 43, 67, 73, 85, 86, 100, 111]. Die genannten Vertreter sind grampositive, anaerobe Stäbchenbakterien, nicht sporenbildend, nicht fadenförmig, unbeweglich und können auf sauren Medien wachsen. Sie werden als runde glatte Kolonien ohne Filamente, ganzrandig, sahnig gefärbt bis undurchsichtig charakterisiert. Diese Bakterien können unter anderen Laktat und Acetat als Endprodukt des Stoffwechsels produzieren [28, 43, 67, 97].

2.5 Bifidobakterien

In der Literatur wird diskutiert, ob auf Grundlage neuer Erkenntnisse der HSP60 DNA Sequenzen in Übereinstimmung mit der 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse *B. denticolens* und *B. inopinatum* nicht zur Gattung der Bifidobakterien gehören, taxonomisch neu eingeordnet werden müssten und somit eine eigenständige Gruppe darstellen sollten. Eine Begründung dafür liegt darin, dass *B. denticolens* und *B. inopinatum* zu den anderen Bifidobakterium Arten eine sehr niedrige Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen (Similarity) von nur 84-92% aufweisen [47]. *B. dentium* kann eine viel höhere Vielfalt an Kohlenhydraten verstoffwechseln als andere Bifidobakterien und auch als *S. mutans*. Die entschlüsselten DNA-Sequenzen weisen Virulenzfaktoren mit klebenden, säuretoleranten Eigenschaften und einen Schutz gegen toxische Substanzen und Eigenschaften zur Verstoffwechselung von Speichelderivaten auf. Damit hat *B. dentium* die Fähigkeit, in bestehende kariöse Läsionen zu infiltrieren und zu kolonisieren [104].

In einer Studie bei Kindern wurde *B. dentium* bei 14 von 16 Milchmolaren gefunden und eine wichtigere Rolle in tiefen kariösen Läsionen zugesprochen als den Hauptvertretern der Laktobazillen. Das Bakterium wurde unter anderem auch im Gastrointestinaltrakt von gesunden Erwachsenen nachgewiesen, es zählt zu den grampositiven und strikt anaerob lebenden Bakterien [7, 67, 94].

2.6 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse im oralen Mikrobiom

Unter Verwendung von Sequenzanalysen der 16S rRNA Gene konnten die meisten der vorherrschenden Bakterienarten in der Mundhöhle identifiziert werden, weil durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse eine um bis zu 40% bessere Identifikation von Phylotypen möglich ist als mit konventionellen oder kommerziellen kulturabhängigen

Methoden [1, 5, 7, 18, 22, 23, 29, 38, 59, 83, 84, 85, 88]. Diese 1977 eingeführte Methode gilt als zuverlässiges Werkzeug, um orale Isolate zu identifizieren und damit die Zusammenhänge der oralen Mikroflora weiter zu erforschen [29, 34, 107]. Auf der ribosomalen rDNA, welche in allen Organismen vorhanden ist, sind verschiedene spezifische Kopien über mehrere Gene verteilt und können als konservierte, variable und hypervariable Regionen identifiziert und damit als unterscheidliche Mikroorganismen differenziert werden, wobei die analysierte rDNA Sequenz für jede Art individuell ist. Für die Identifikation sind die DNA Extraktion, in-vitro Amplifikation und die Charakterisierung wichtige Schritte. Bei der Charakterisierung werden die gewonnenen Sequenzen mit Referenzsequenzen aus verschiedenen Gen-Datenbanken verglichen, um ein spezifisches Ergebnis zu erhalten [105]. Die partiellen Sequenzen der einzelnen Proben werden über eine html- basierte Eingabemaske für bereits existierende Analysesoftware wie FASTA und CLUSTAL W bei den verschiedenen Gen-Datenbanken, zum Beispiel RDP-II oder Blast eingegeben und können so mit vorhandenen Referenzsequenzen abgeglichen werden [40].

Es wird jedoch bemängelt, dass es keine festgelegten Richtlinien zum Nutzen der Technik oder für die Auswertung der Sequenzen gibt, da viele Studien mit unterschiedlichen Similaritys, also prozentualen Übereinstimmungen mit Referenzsequenzen arbeiten und es sinnvoll ist, die höchsten Similaritys von >99,5% anzusetzen, weil schon eine Abweichung von 0,5% eine neue Spezies bedeuten kann [45]. Für die Identifikation von Phylotypen durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse wird empfohlen, eine Anzahl von 500 Basenpaaren zu nutzen und die variable 5' Region für eine genaue Bestimmung einzubeziehen. Für die Anlage von Stammbäumen sollten jedoch Sequenzen von circa 1500 bp verwendet werden [65, 77, 107].

Durch die auf der MicroSeq 16S rRNA basierenden Sequenzanalyse, welche in dieser Studie genutzt wurde, konnten auch in anderen Studien klinisch signifikante orale, anaerobe, grampositive bakterielle Isolate, die auf Rogosa-Agar angezüchtet wurden, mit mehrdeutigen biochemischen Profilen nachgewiesen und die Erfolgsrate der Artenbestimmung um über 20% gesteigert werden [57, 108].

Die Kombination von Kultur- und DNA-Analyse hat gezeigt, dass eine vielfältige bakterielle Gemeinschaft in Dentinkaries gefunden wurde und zahlreiche neue Taxa vorhanden sind. Grampositive Bakterien und Laktobazillen sind die am häufigsten nachgewiesenen Arten in der Mikroflora kariöser Läsionen. Es besteht kein

signifikanter Unterschied zwischen der Mikroflora im Dentin und an der Zahnpulpa tiefer kariöser Läsionen [75].

2.7 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Bakterien eines biochemisch voruntersuchten Keimspektrums aus tiefen kariösen Läsionen von extrahierten Milchmolaren durch Gen-Sequenzierung taxonomisch zu spezifizieren. Die biochemischen Voruntersuchungen klassifizierten die Isolate als Laktobazillen anhand einer positiven Gramfärbung stäbchenförmiger Bakterien mit einer nachgewiesenen Vancomycin-Resistenz und einer negativen Katalase-Reaktion.

3 Material und Methode

3.1 Studiendesign

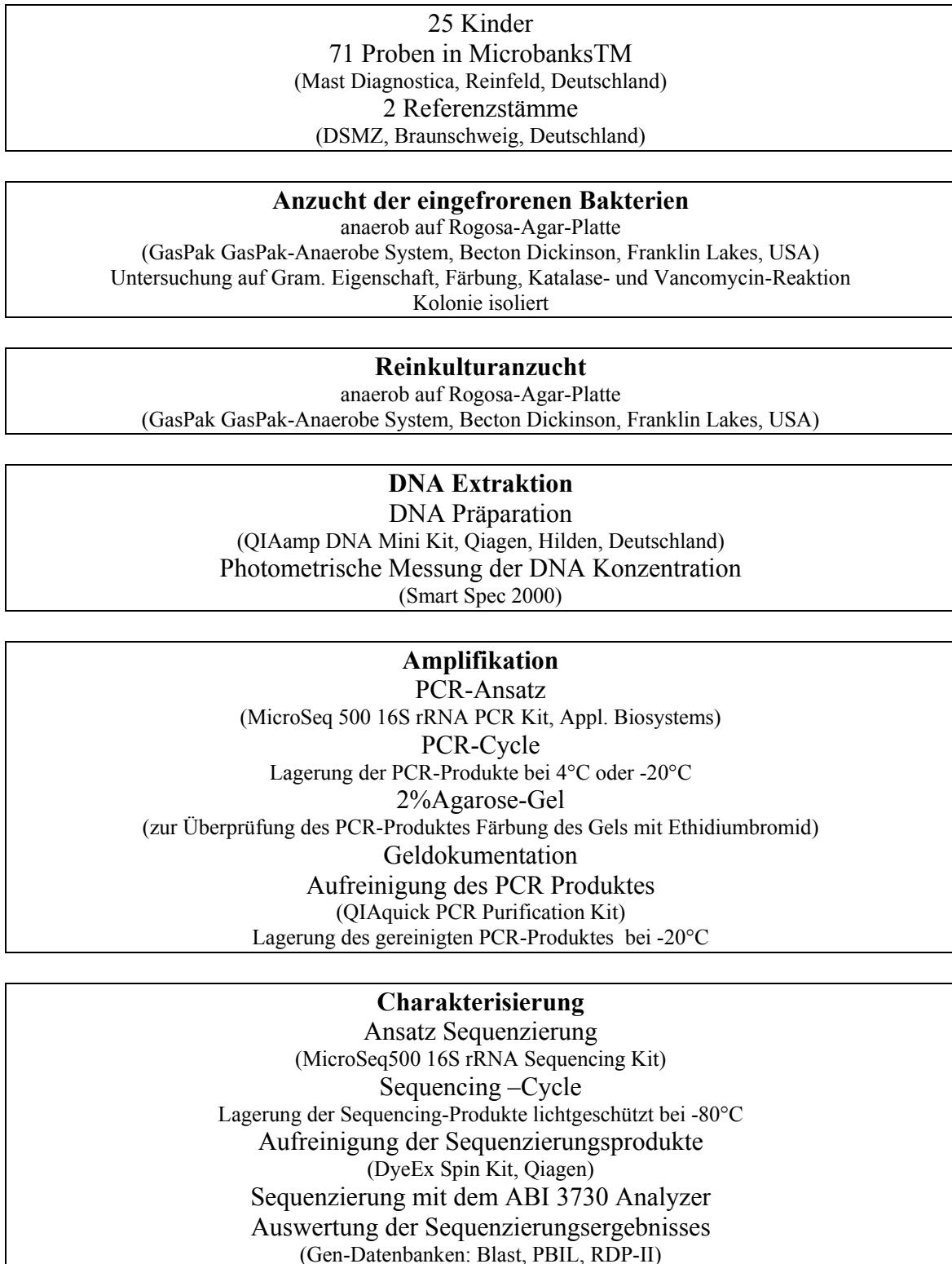


Abb. 1: Studiendesign

3.2 Einverständniserklärung

Vor Studienbeginn wurden alle Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, ausführlich über Umfang und Bedeutung der Untersuchung aufgeklärt. Die Patienten unterzeichneten eine Einverständniserklärung nach der Erklärung von Helsinki II. Das Design der Studie wurde von der lokalen wissenschaftlichen Ethikkommission (Dossier Nr. 02-073) genehmigt.

3.3 Gewinnung kariöser Dentinproben

71 Wildstämme wurden im Rahmen einer klinischen Studie zur Evaluierung der Mikroflora aus tiefen kariösen Dentinläsionen in Milchmolaren von 25 Kindern gewonnen. Diese Stämme wurden durch biochemische Tests als Laktobazillen identifiziert. Vorübergehend wurden diese bei -20°C in Microbanks TM (Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland) gelagert, bevor sie dieser Arbeit zur Verfügung standen. Die Zuordnung der Wildstämme ist im Anhang in Tabelle 3 unter 8.4 einzusehen.



Abb. 2: Tiefe kariöse Läsionen an Milchfront- und Seitenzähnen

3.3.1 Der selektive Nachweis von Laktobazillen

Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden die Rogosa-Platten makroskopisch beurteilt. Morphologisch unterschiedliche Kolonien wurden auf Rogosa-Agar passagiert und in Reinkultur angezüchtet. Die Kolonien wurden mit einer sterilen Öse mittels der Drei-Ösen-Ausstrichtechnik auf eine Rogosa-Platte ausgestrichen und bei 37°C anaerob für 3 Tage inkubiert. Zusätzlich wurde eine mikroskopische Inspektion durchgeführt und protokolliert. Nachdem die Kolonien auf Objektträgern ausgestrichen wurden, sind diese mittels Gram-Färbung sichtbar gemacht worden. Des Weiteren wurden eine Vancomycin-Testung und eine Katalase-Reaktion durchgeführt. Laktobazillen sind überwiegend grampositive Stäbchen, Vancomycin resistent und reagieren gegenüber Katalase negativ. Die Stämme, welche nach Norm reagierten, wurden zur Aufbewahrung in Microbanks TM (Mast Diagnostica, Reinfeld / Deutschland) konserviert. Die Ergebnisse sind im Anhang unter 8.2 in Tabelle 3 aufgelistet.

3.4 Kultivierung der Stämme und phänotypische Beschreibung

Eine tiefgekühlte Glasperle aus den Microbanks TM wurde von jedem in den Voruntersuchungen als Laktobazillus identifizierten Stamm aus der konservierten Suspension entfernt und auf einer Rogosa-Agar-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für 72 h unter anaeroben Bedingungen (GasPak GasPak-Anaerobe System, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) inkubiert. Danach ist eine reine einzelne Kolonie mit einer sterilen Öse im Drei-Ösen-Ausstrich auf eine neue Rogosaplatte ausgestrichen und unter den gleichen Bedingungen für weitere 72 h anaerob inkubiert worden.

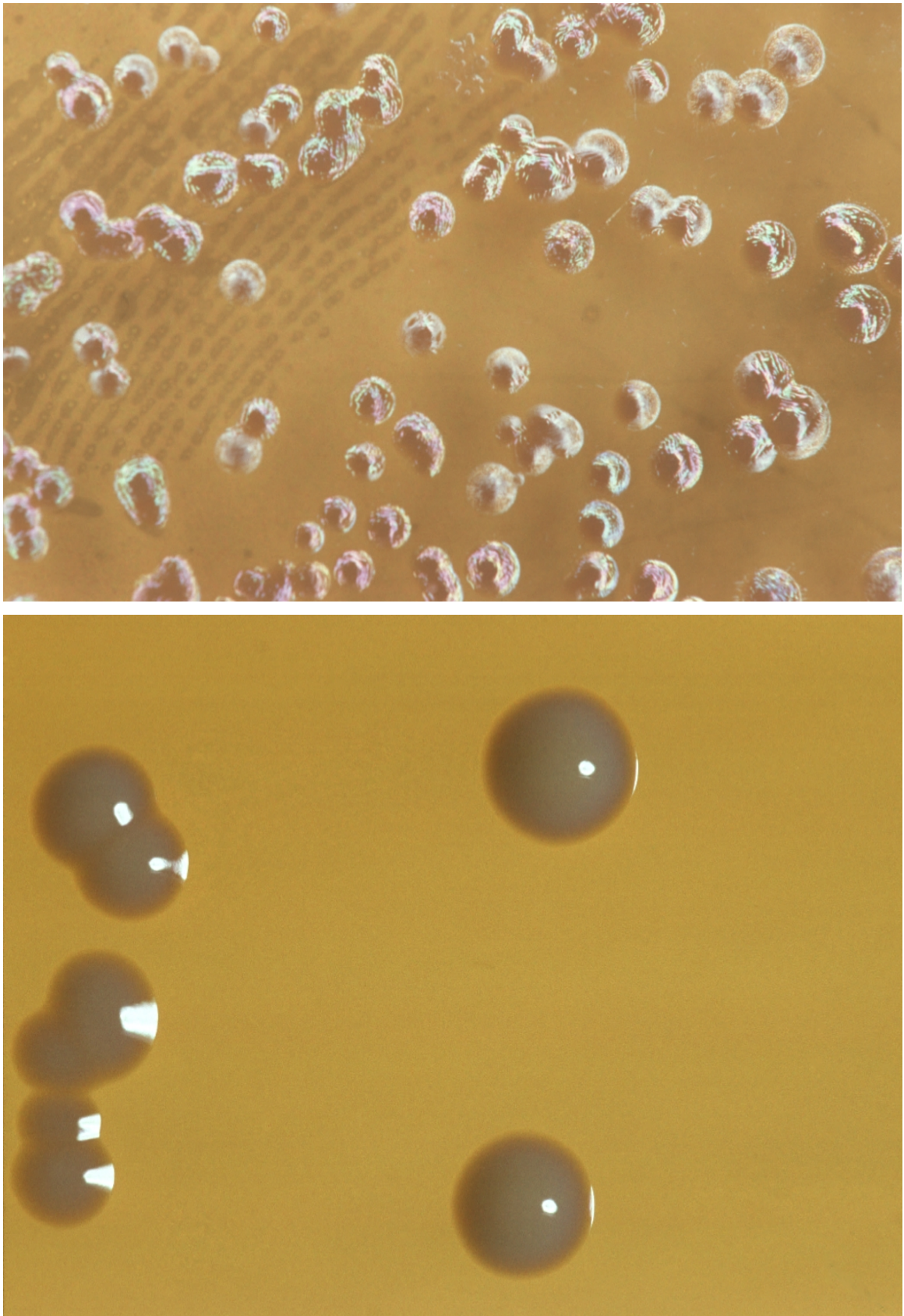


Abb. 3: Kulturanzucht von Laktobazillen auf einer Rogosa-Agar-Platte

3.5 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse

An allen Bakterienstämmen wurde eine 16S rRNA Gen-Sequenzierung durchgeführt. Mehrere Kolonien wurden von der Kulturplatte mit einer sterilen Impföse unter der Clean Bench abgestrichen und in einer 180 µl Enzymlösung mit 20 mg/ml Lysozym, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100 aufgelöst. Die gesamte Suspension wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Suspension alle 10 min gemischt. Am Ende des Vorgangs wurde die Suspension mit 6 rpm zentrifugiert, dann mit 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 200 µl Puffer AL versetzt und schließlich wurde die Inkubation bei 56°C für 30 min fortgesetzt. Alle 10 min wurde die Suspension gemischt und am Ende mit 6 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde in klaren, viskösen Lysaten ausgefällt. Die Suspension wurde 15 sec mit absolutem Ethanol 98% gemischt und in DNeasy Minisäulen 2 ml (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) übertragen. Ethanol (70% vol/vol)-basierten Puffer AW1 und AW2 wurden nacheinander die Säulen übertragen, danach für 1 min zentrifugiert bei 13.000 xg und 18°C. Dann wurden die QIAamp Minisäulen mit Puffer AE gefüllt und bei Raumtemperatur (18°C) 5 min inkubiert und nochmals zentrifugiert. Das Eluat wurde in einem sterilen Eppendorf-Röhrchen gesammelt und bei -20°C gelagert.

Die Konzentration von DNA-Template wurde gemessen. Bei Werten zwischen 23 und 30 ng mit einer Absorption zwischen 0,1 bis 1,0 (Smart Spec 2000) wurde das Eluat weiter untersucht. In jeder PCR waren eine Negativkontrolle, welche mit destilliertem Wasser gefüllt war, eine Positivkontrolle und die jeweiligen Proben mit DNA enthalten (PTC 200, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Es wurden jeweils 25 µl PCR Master Mix (MicroSeq 500 16S rDNA PCR-Kit, Appl. Biosystems) und 25 µl der bakteriellen DNA für die Amplifizierung gemischt. Die Suspension mit 25 µl Master Mix unter PCR-Bedingungen zur Vervielfältigung der 16S rDNA umfasste eine anfängliche Denaturierung bei 95°C für 10 min, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung bei 90°C gefolgt von 30 sec, Primerhybridisierung bei 60°C für 30 sec und Elongation bei 75°C für 45 sec. Nach den Amplifikationszyklen wurde eine abschließende Elongation bei 72°C für 10 min durchgeführt. Jeder Lauf enthielt eine Negativkontrolle mit einem 25 µl MasterMix/25 µl HPLC Wassergemisch und eine Positivkontrolle mit einem 25 µl *E. coli*-Suspensat und 25 µl MasterMix-Gemisch.

3.5.1 Überprüfung der PCR Produkte durch Gelelektrophorese

Zu der Überprüfung der Produkte wurde ein Agarosegel (300 ml) gegossen. Dieses Gel enthielt 6 g Agarose (Fa. ICN Biomedicals, Art. Nr. 193983) und 300 ml TAE-Gebrauchspuffer- / Laufpuffer und wurde aus einer Mischung von 20 ml TAE Stammlösung (121 g Tris base, 28,55 ml Essigsäure 99,7%, 50 ml 0,5 M EDTA pH 8,0) mit 980 ml destilliertem Wasser erstellt. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer Horizon 20-25, Gibco BRL Life Technologies gegossen und verwendet. Vor dem Elektrophoreselauf wurde der Laufpuffer für circa 10 min bei -72°C abgekühlt. Jeweils 12,5 µl der PCR Produkte, der Negativkontrolle und der Positivkontrolle wurden mit je 2,5 µl 6x Loading-Dye-Buffer (Fa. MBI Fermentas #R0611) in das Gel pipettiert. Zusätzlich wurde ein Gemisch aus 2,0 µl 100bp DNA-Ladder, 10,5 µl destillierten Wasser und 2,5 µl 6x Loading-Dye-Buffer in den ersten Slot einpipettiert. Der Probenlauf wurde bei einer Stromstärke von 150 Volt, einer Spannung von 135 mA in 90 min durchgeführt.

Nach dem Elektrophoreselauf wurden die Nukleinsäuren mit einer Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml) Fa. Roth Art. Nr. 2218.1 für 10 min eingefärbt und unter UV Licht die Slots überprüft und dokumentiert.

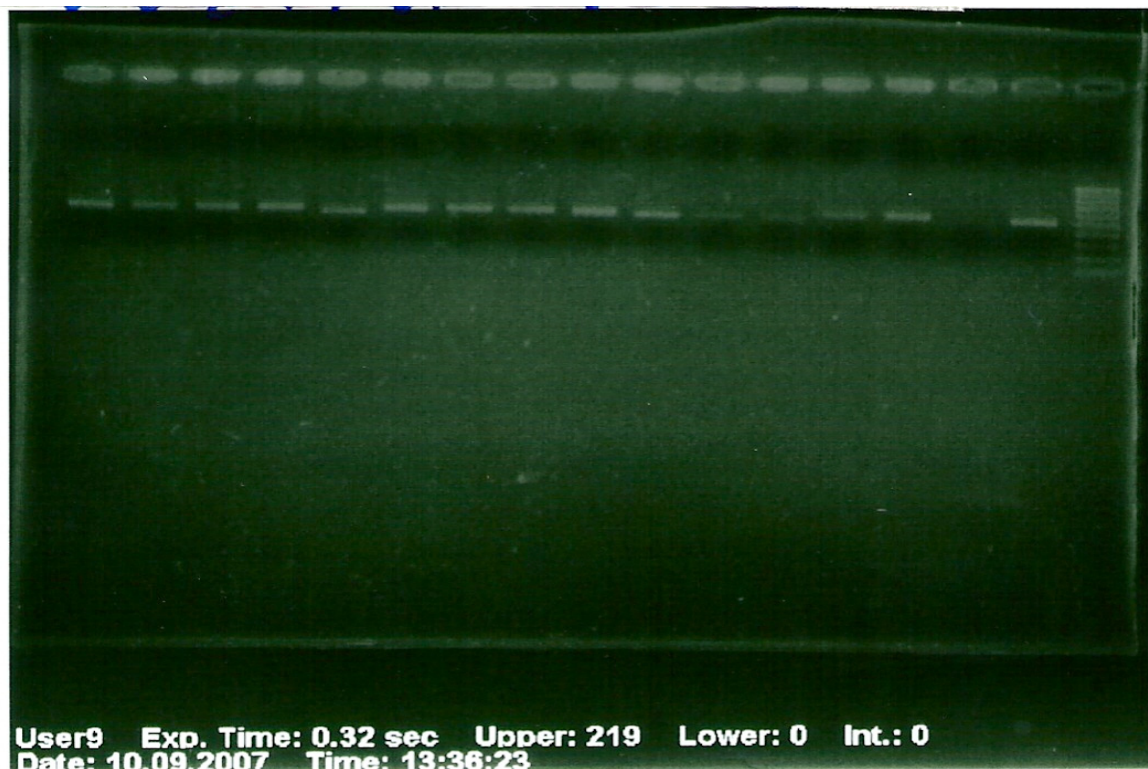


Abb. 4: Dokumentation der Gelelektrophorese

3.5.2 Aufreinigung des PCR Produktes

Die bakterielle DNA wurde mit einem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Das Verfahren beinhaltet die Mischung von 5 Volumeneinheiten Puffer PB zu 1 Volumeneinheit der PCR-Probe. Die Lösung wurde in eine QIAquick Säule pipettiert und bei voller Geschwindigkeit (13.000 rpm) zentrifugiert. Die QIAquick-Säule wurde in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 750 µl Puffer PE dazugegeben. Die Säulen wurden wiederholt für 1 min zentrifugiert und bei Raumtemperatur mit 30 µl HPLC Rost-Wasser für die vollständige Elution der gebundenen DNA inkubiert. Schließlich wurden die Säulen bei voller Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert und das Eluat wurde dem Cycle-Sequencing mit dem MicroSeq 500 16S rDNA-Sequenzierung Modul (MicroSeq 500 16S rDNA PCR Kit, Appl. Biosystems) unterzogen. Das Reaktionsgemisch (20 µl) enthielt 7 µl des gereinigten PCR-Produktes und 13 µl der fertigen Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzierungsmischung in getrennten Reaktionen. Die Mischungen wurden in 25 Zyklen, die aus 96°C für 10 sec, 50°C für 5 sec und 60°C für 4 min bestanden, (Rapid Thermal Rampe von 1°C/sec zwischen den Schritten) vervielfältigt, gefolgt von einer 4°C Haltezeit. Das MicroSeq 500 16S rDNA Bakteriensequenzierungskit ermöglicht die Identifizierung der DNA-Sequenz von Bakterien der ersten 500 Basenpaare des Bakteriums des 16S rRNA Gens.

Eine hochwertige Sequenzierung der Daten wurde durch eine zuverlässige Hochdurchsatzreinigung der sequenzierten Produkte (DyeEx Spin Kit, Qiagen) gewährleistet. Die Spin-Säule wurde vorsichtig für 3 min bei 2900 U/min zentrifugiert. Ein neues Zentrifugenröhrchen wurde auf der Spin-Säule platziert und das Sequenzierungsprodukt auf das Gel-Bett der Säule gelegt und weitere 3 min bei 2900 U/min zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gereinigte DNA und wurde bei -20°C gelagert.

3.5.3 Darstellung der Nukleinsequenzen und Auswertung

Eine endgültige Mischung enthielt 4 µl der gereinigten Probe und 16 µl destilliertes Wasser. Diese Mischung wurde mit einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (ABI 3730 Analyzer) mit Hilfe der BigDye Terminator Chemie (Applied Biosystems) für Farbstoff-Kennzeichnung der einzelnen Basen untersucht. Zur

Identifizierung der unbekannten Bakterien wurden die 16S rDNA-Sequenzen durch die Ribosomal Database Project (RDP-II), Blast auf Pub Med und Pole Bio-Informatique Lyonnais (PBIL) Datenbanken untersucht und ausgewertet. Hierzu wurden die experimentell ermittelten Sequenzen mit bereits in den Datenbanken gesammelten Sequenzen verglichen.

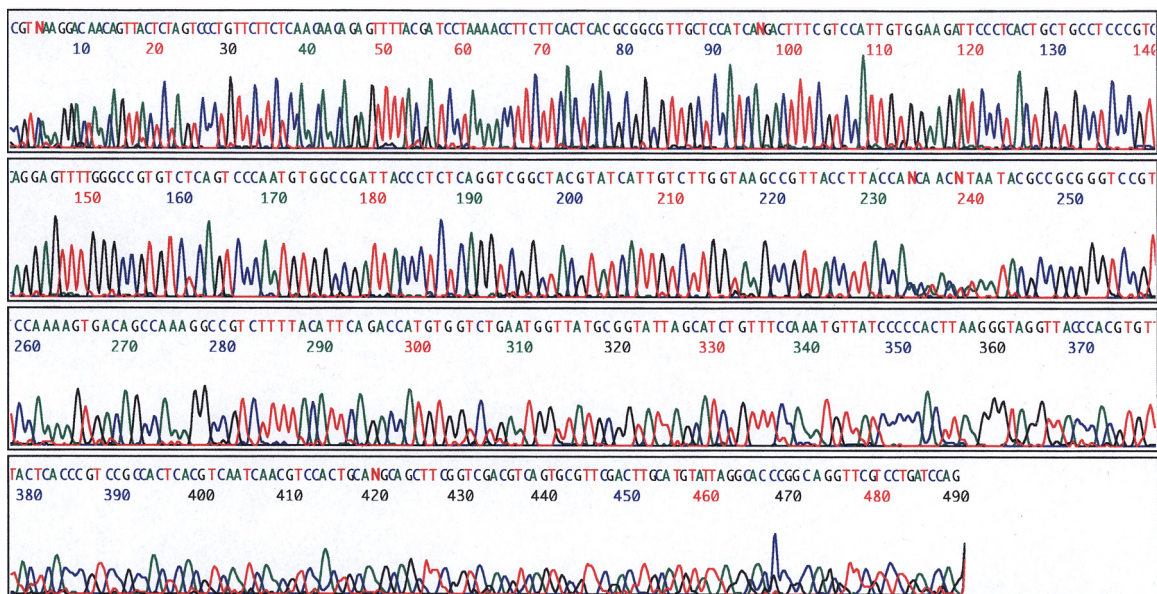


Abb. 5: visuelle Darstellung einer Sequenz

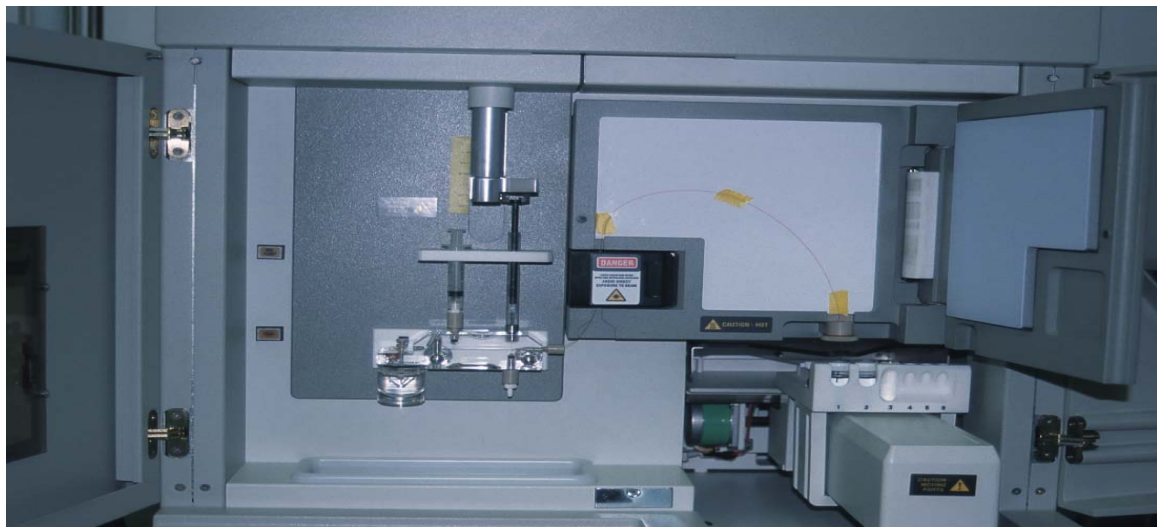


Abb. 6: ABI 3730 Analyzer

3.5.4 Gen-Datenbänke Blast / PBIL / RDP-II

In dieser Studie wurde unter anderen die Gen-Datenbank Blast (Basic Local Alignment Search Tool) genutzt. Diese Datenbank stellt das weltweit am meisten genutzte Programm zur Verfügung, um über eine Webschnittstelle experimentell gewonnene

biologische Sequenzdaten mit bereits vorhandenen Sequenzen gegenüberzustellen und vergleichen zu können [70].

Aus dem Programm wurde die blastn-Methode gewählt, welche Nukleotidsequenzen mit einer Nukleotidsequenzdatenbank vergleicht. Das Programm stellt verschiedene lokale Alignments der experimentellen Sequenz mit bereits vorhandenen Sequenzen der Datenbank gegenüber. Bei Übereinstimmungen wird das lokale Alignment immer weiter vergrößert und damit eine immer höher wählende Identifizierung des experimentellen Stranges gewährleistet. Dies wird als Similarity bezeichnet und ist eine quantitative Bewertung der Ähnlichkeit der Suchsequenz [35]. Das Programm Blast nutzt unter anderem die Datenbanken GenBank, EMBL Data Library, DNA Database of Japan, NCBI Reference Sequence, SWISS-PROT, General database identifier und Local Sequence identifier.

Allgemein wird über eine html- basierte Eingabemaske, für die bereits Analysesoftware wie FASTA und CLUSTAL W existiert, die experimentell gewonnene Sequenz eingegeben und mit den Referenzsequenzen der verschiedenen Gen-Datenbanken wie Blast, RDP-II oder PBIL verglichen [40].

Die Gen-Datenbank PBIL (Pole Bio-Informatique Lyonnais) ist von der Universität Claude Bernard Lyon – 1 und dem Institut für Biologie und Chemie entwickelt worden. Das Gegenüberstellen der experimentellen Sequenzen und der bereits wissenschaftlich ausgewerteten und identifizierten Stränge läuft über Alignments wie bei Blast. Bei PBIL werden auch andere Datenbanken mit einbezogen wie GenBank, HOMD, NBRF, EMBL, SWISS-PROT/TREMBL, Hovergen, NRSub und EMGLib. Die Datenbank ermöglicht auch die Nukleotidsequenzen analytisch zu verarbeiten.

Die Gen-Datenbank RDP-II ist ein Projekt der Michigan State University. Alle Daten gehören der Universität und dürfen wie in den anderen Datenbanken nur für nicht kommerzielle Forschungszwecke verwendet werden. RDP-II beinhaltet fast 450000 Sequenzen und ist wie Blast mit der GenBank verbunden. RDP-II gehört neben Blast zu den Gen-Datenbanken mit den besten Sequenzen [107].

4 Ergebnisse

Diese Arbeit verwendet das Material von 71 voruntersuchten und als Laktobazillen gekennzeichneten Wildstämmen, die von 25 Kindern mit verschiedenen kariösen Läsionen stammen. Bei der Untersuchung wurden 3 Isolate nicht berücksichtigt, da diese in der Erstuntersuchung kein Bakterienwachstum aufwiesen.

In die Auswertung wurden somit 68 Wildstämme von 23 Kindern einbezogen.

An allen Bakterienstämmen wurde eine 16S rRNA Gen-Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzen von jedem Wildstamm wurden mit den Gen-Datenbanken Blast, RDP-II und PBIL ausgewertet. Der Score der höchsten Übereinstimmung, welcher bei der Gegenüberstellung der experimentell ermittelten Nukleotidsequenzen und Sequenzen der verschiedenen Nukleotidsequenzdatenbanken ermittelt wurde und der daraus festgelegte Genus, wurden protokolliert. Die Ergebnisse sind im Anhang unter 8.2 in Tabelle 3 einzusehen.

Jedem Isolat wurde eine Accession Number zugeordnet und ist als Referenzstamm auf der Gen-Datenbank Blast veröffentlicht worden.

4.1 Keimflora der Dentinkaries

Von 68 Wildstämmen, die als Laktobazillus gekennzeichnet waren, handelt es sich bei 46 Isolaten tatsächlich um Laktobazillus Arten. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 67,6%.

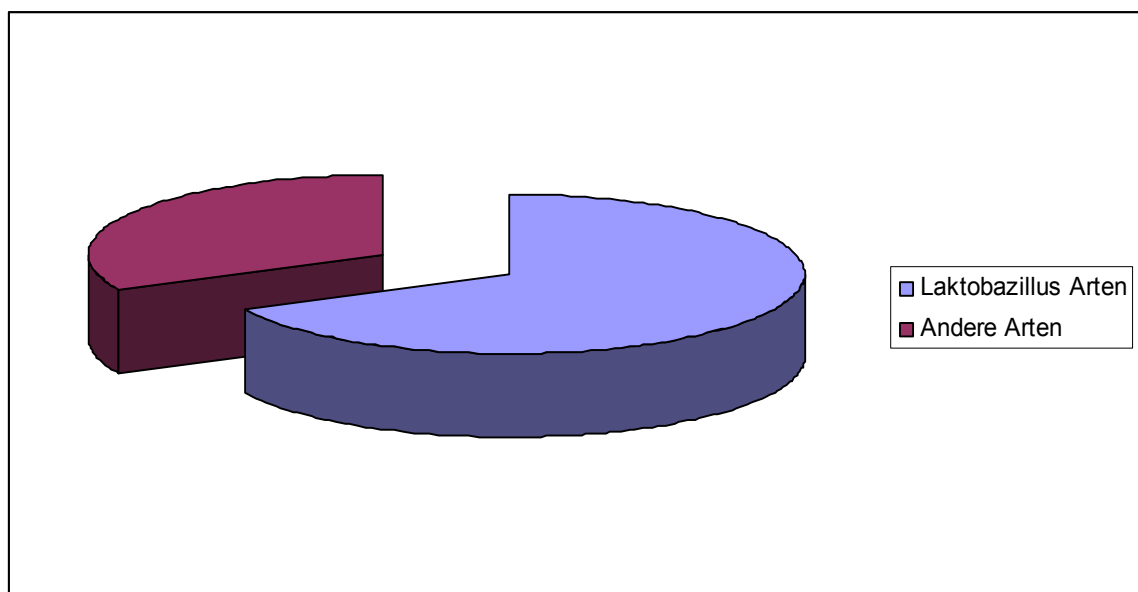


Abb. 7: Darstellung der Gesamtverteilung der auf Rogosa-Agar angezüchteten Arten

In den anderen 22 Isolaten konnten keine Laktobazillen festgestellt werden. Hier wurden Actinobacteria und eine Streptokokkenart identifiziert.

Actinobacteria (n=19) waren zu 27,9% nachgewiesen worden, davon sind 8 Isolate *Scardovia inopinata*, 6 Isolate *Bifidobacterium dentium*, 4 Isolate *Parascardovia denticolens* und 1 Isolat *Osnella profusa*.

Die Streptokokkenart, *Streptococcus sobrinus* (n=3), weist einen Anteil von 4,4% auf.

Diese Ergebnisse sind unter 8.2 in Tabelle 2 dargestellt.

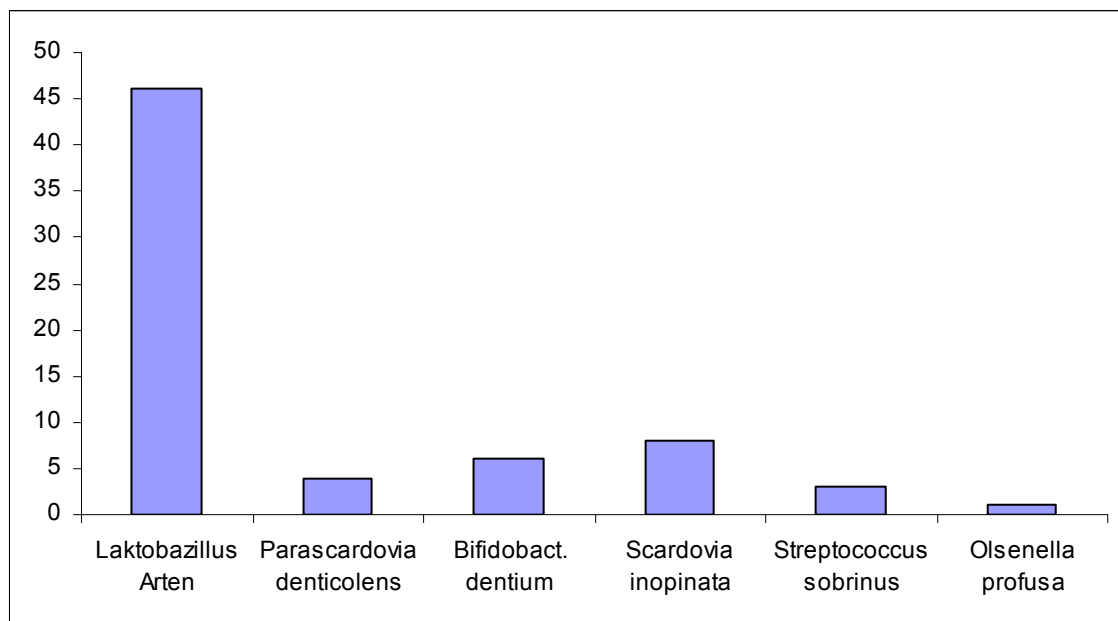


Abb. 8: Darstellung der anderen Bakterienarten gegenüber den Laktobazillus Arten.

4.1.1 Laktobazillus Arten

Bei den 46 von Rogosa-Agar isolierten Kolonien, die als Laktobazillus Art identifiziert werden konnten, handelt es sich um grampositive Isolate mit negativer Katalase-Reaktion. Die Stämme wurden zu 74% (n=34) als grampositive Stäbchen, zu 17,4% (n=8) als stäbchenförmig / kokkoid und 4,3% (n=2) als fadenförmig charakterisiert. Ein Prozentsatz von 71,7% der Stämme wies keinen Hemmhof von Vancomycin auf. Somit waren 28,3% resistent.

Von den identifizierten Arten war *Lactobacillus fermentum* mit einem Prozentanteil von 19,6% der am häufigsten isolierte Stamm.

Die phylogenetische *L. casei* Gruppe hat zusammenfassend einen Prozentanteil von 45,7% und besteht aus *L. casei* (n=5), *L. paracasei* (n=7), *L. rhamnosus* (n=8) und *L. plantarum* (n=1).

Die phylogenetische *L. reuteri* Gruppe hat zusammenfassend einen Prozentanteil von 10,8% und besteht aus *L. reuteri* (n=1), *L. oris* (n=2), und *L. vaginalis* (n=2).

Der Laktobazillenstamm *L. gasseri* (n=8) erreichte mit einem Prozentanteil von 17,4% einen sehr hohen Stellenwert. Alle *L. gasseri* Isolate wiesen einen Hemmhof bei einer Vancomycin-Konzentration von 30 µg auf.

Weitere Spezies wie *L. parabuchneri* (n=1) und eine undefinierte Laktobazillus Art (n=1) wurden nur in geringer Zahl vorgefunden.

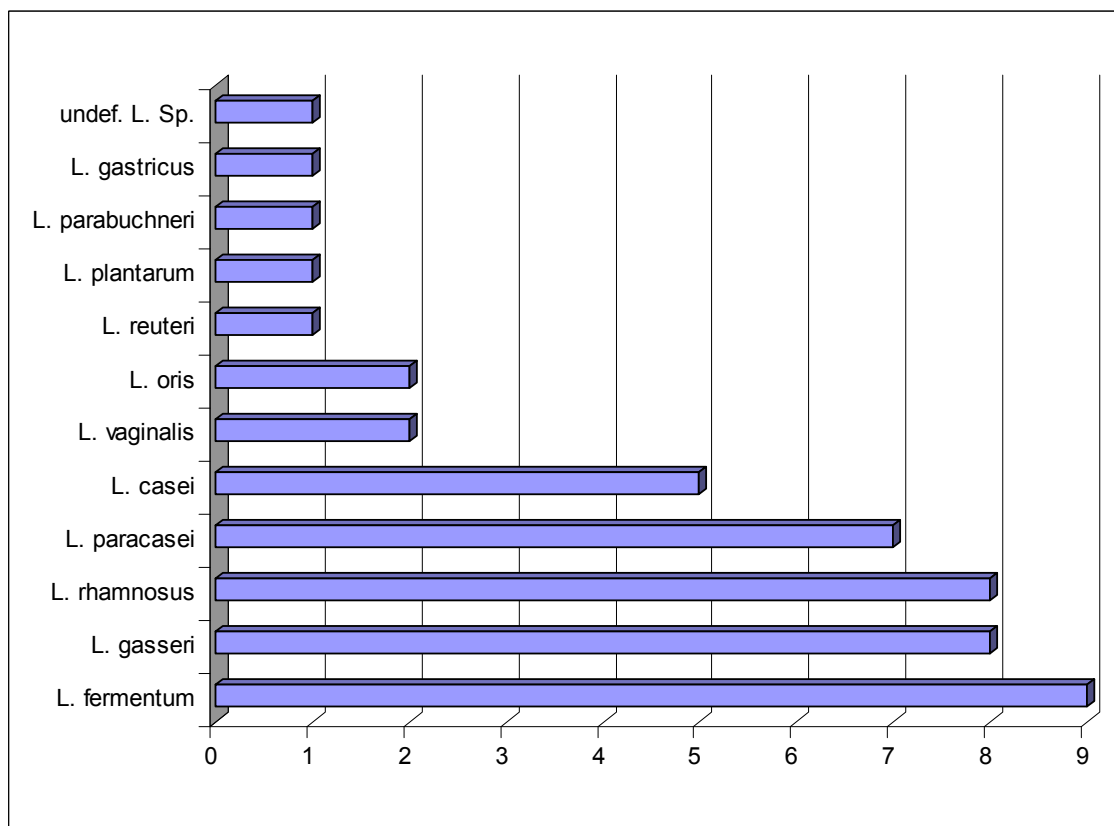


Abb. 9: Darstellung der nachgewiesenen Laktobazillen nach Häufigkeit.

4.1.2 Actinobacteria

In einem relativ hohen prozentualen Anteil wurden *Bifidobacterium dentium* (n=6), *Scardovia inopinata* (n=8) und *Parascardovia denticolens* (n=4), *Olsenella profusa* (n=1) identifiziert.

Diese orale Gruppe der Actinobacteria hat zusammenfassend einen Prozentanteil von 27,9% (n=19). Sie sind grampositive, stäbchenförmige, nicht bewegliche, nicht sporige und fakultativ anaerobe Bakterien.

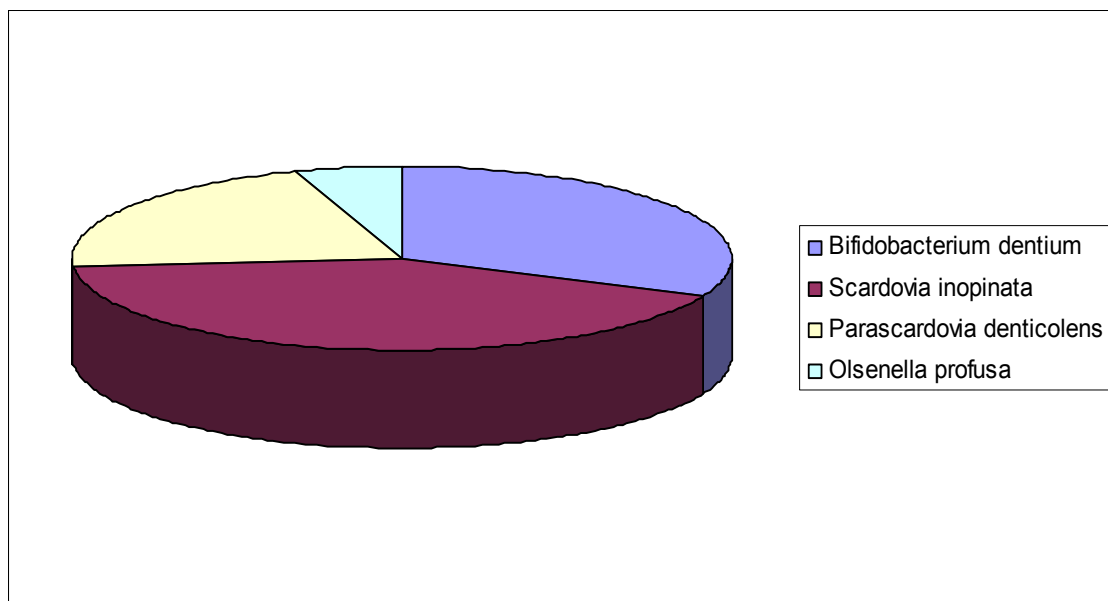


Abb. 10: Darstellung der Häufigkeit nachgewiesener Actinobacteria

Die Gruppe der Actinobacteria hatten zu 94,4% eine negative Katalase-Reaktion. Bei einem *Bifidobacterium dentium* Stamm konnte kein Ergebnis festgestellt werden.

Die *Bifidobacterium dentium* wurden zu je 50% als stäbchenförmig grampositiv und stäbchenförmig / kokkoid grampositiv charakterisiert. Zu einem Prozentsatz von 100% ist ein Hemmhof bei einer Vancomycin-Konzentration von 30 µg nachgewiesen worden.

Die 8 *Scardovia inopinata* Stämme haben zu einem Prozentsatz von 100% eine negative Katalase-Reaktion. Zu 87,5% wurden sie als stäbchenförmig und grampositiv charakterisiert und zu 12,5% als stäbchenförmig/kokkoid. Bei 25% der Stämme wurde ein Hemmhof bei einer Vancomycin-Konzentration von 30 µg nachgewiesen.

Die *Parascardovia denticolens* haben zu einem Prozentsatz von 100% eine negative Katalase-Reaktion und wurden zu je 50% als stäbchenförmig grampositiv und stäbchenförmig/kokkoid grampositiv charakterisiert. Zu einem Prozentsatz von 75% wurde ein Hemmhof bei einer Vancomycin-Konzentration von 30 µg nachgewiesen.

In den 68 Isolaten wurde ein Stamm *Olsenella profusa* nachgewiesen. Dieser Stamm wurde als grampositives Stäbchen mit negativer Katalase-Reaktion und einer Hemmhofbildung bei Vancomycin-Konzentrationen von 30 µg und 5 µg charakterisiert.

4.1.3 *Streptococcus sobrinus*

In der Untersuchung wurden 3 *S. sobrinus* Stämme isoliert. Diese Isolate haben einen prozentualen Gesamtanteil von 4%.

Die Stämme haben zu einem Prozentsatz von 100% eine negative Katalase-Reaktion und wurden zu 33,3% als stäbchenförmig grampositiv und 66,6% als stäbchenförmig / kokkoid grampositiv charakterisiert. Zu einem Prozentsatz von 100% wurde ein Hemmhof bei einer Vancomycin-Konzentration von 30 µg und 15 µg nachgewiesen.

4.2 Artenvielfalt der Isolate

Bei 12 von 23 Kindern wurden bei den zur Verfügung gestellten Isolaten, die als Laktobazillen gekennzeichnet waren, nicht nur verschiedene Laktobazillus Arten, sondern auch andere Arten nachgewiesen.

Bei 5 von den Kindern wurden mehrere unterschiedliche Laktobazillen gefunden wie *L. paracasei* (n=4), *L. fermentum* (n=2), *L. rhamnosus* (n=2), *L. reuteri* (n=1), *L. gasseri* (n=1), *L. casei* (n=1), *L. parabuchneri* (n=1).

Bei 3 Kindern traten andere Arten auf wie *Parascardovia denticolens* (n=1), *Bifidobacterium dentium* (n=2), *Scardovia inopinata* (n=3), *Streptococcus sobrinus* (n=1), *Olsenella profusa* (n=1).

Bei 3 Kindern wurde nur ein einzelner Laktobazillusstamm nachgewiesen wie *L. casei* (n=2) und *L. rhamnosus* (n=1).

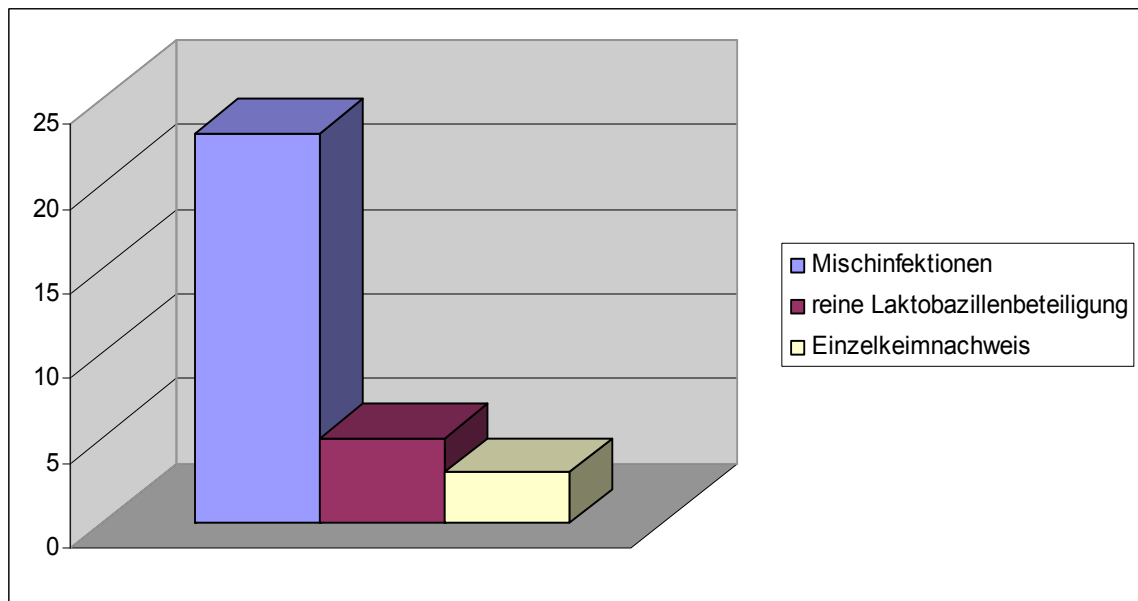


Abb. 11: Darstellung der Artenvielfalt in als Laktobazillen gekennzeichneten Wildstämmen

4.3 Auswertung der verschiedenen Datenbanken

Die Auswertung der Nukleotidsequenzen mit den Nukleotidsequenzdatenbanken Blast, RDP-II und PBIL ergaben Abweichungen in den Ergebnissen. Die Nukleotidsequenzdatenbank PBIL unterschied sich in 11,7% (n=8) von der Nukleotidsequenzdatenbank Blast und die Nukleotidsequenzdatenbank RDP-II in 20,6% (n=14) von der Nukleotidsequenzdatenbank Blast.

Die Nukleotidsequenzdatenbank Blast hatte bei jedem Isolat eine Übereinstimmung von 100%. Die Nukleotidsequenzen wurden eindeutig identifiziert und benannt.

Die Nukleotidsequenzdatenbank RDP-II hatte bei den verschiedenen Isolaten eine Similarity zwischen 93% und 100%. Die Nukleotidsequenzdatenbank PBIL hatte Similarity Werte zwischen 90% und 100%.

Die Hauptunterschiede zwischen Blast und den anderen Datenbanken liegen bei RDP-II zu einem Prozentsatz von 17,6% (n=12) in der phylogenetisch eng verwandten *L.casei* Gruppe, wohingegen dies bei BiBi zu einem Prozentsatz von 10,2% (n=7) der Fall war.

RDP-II ermittelte in 57,1% (n=8) der Fälle die gleiche Similarity für *L.casei* / *L.paracasei*, PBIL ermittelte in 37,5% (n=3) der Fälle die gleiche Similarity für *L.casei* / *L.paracasei*. Dadurch konnte kein genauer Stamm festgelegt werden.

Durch die Nukleotidsequenzdatenbank RDP-II konnte bei 4 Isolaten nur die Gattung bestimmt werden, *Bifidobacterium* (n=3) und *Olsenella* (n=1), die bei den anderen beiden Gen-Datenbanken als *B. dentium* und *O. profusa* identifiziert wurden.

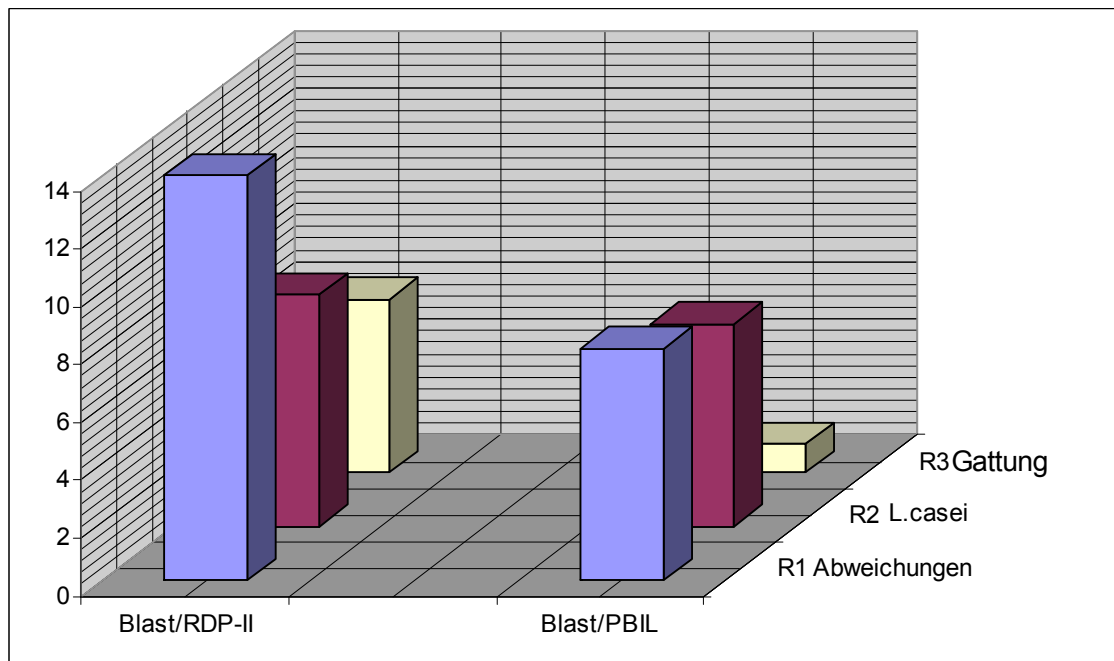


Abb. 12: Darstellung der Abweichungen von RDP-II und PBIL gegenüber Blast.

R1 alle Abweichungen RDP-II (n=14), PBIL (n=8)

R2 Abweichungen in der *L. casei* Gruppe RDP-II (n=8), PBIL (n=7)

R3 Abweichung bei Identifizierung der gleichen Gattung aber unterschiedlicher Art RDP-II (n=6), PBIL (n=1)

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

Ziel dieser Studie war es, die Mikroflora grampositiver, stäbchenförmiger Bakterien mit einer nachgewiesenen und dokumentierten Vancomycin-Resistenz und einer negativen Katalase-Reaktion tiefer kariöser Läsionen aus Milchzähnen nach vorheriger biochemischer Selektierung zu bestimmen.

Von besonderem Interesse war die endgültige Identifikation der primär als Laktobazillen gekennzeichneten Wildstämme.

In dieser Studie wurden die Bakterien auf einem speziellen Nährmedium für Laktobazillen, dem Rogosa-Agar angezüchtet und anschließend eine 16S rRNA Gen-Sequenzierung mit einhergehender DNA-Extraktion und Amplifikation der Sequenzstränge durchgeführt. Abschließend erfolgte die Charakterisierung der Bakterien anhand der gewonnen Sequenzen im Vergleich mit unterschiedlichen Gen-Datenbanken.

Die Bakterien wurden auf einem Rogosa-Agar angezüchtet, die PCR mit Hilfe des MicroSeq500 16S rRNA PCR-Kit (Appl. Biosystems) und die Sequenzen mittels des ABI PRISM 310 Genetic Analyzer erstellt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte durch die Gen-Datenbanken Blast, RDP-II und PBIL.

5.2 Konventionelle Anzüchtung und Nachweis von Laktobazillen

In fortgeschrittener Karies besteht eine ungelöste Komplexität an Bakterien, die Gesamtbelastung übersteigt die Anzahl der kultivierbaren Bakterien [18].

Die Annahme, dass begrenzte Arten Zahn- und Zahnfleischerkrankungen initiieren, führte zur Entwicklung verschiedener spezifischer mikrobiologischer Verfahren für die mikrobiologische Diagnostik [4].

Der Rogosa-Agar, welcher in dieser Studie zur Anzüchtung der als Laktobazillus Art identifizierten Bakterien verwendet wurde, gilt als Selektivmedium für Laktobazillen [87]. Dieses Medium ist seit fast 60 Jahren noch immer die Grundlage moderner diagnostischer Laktobazillen Tests [4]. Es wird davon ausgegangen, dass nur 50% - 80% der oralen Bakterien kultivierbar sind und diese nicht auf herkömmlichen künstlichen Nährmedien im Labor heranwachsen. Des Weiteren erfordert die

Umsetzung ein hohes Maß an Fachwissen [2, 62, 93, 106]. Die Mehrheit aller Laktobazillen wachsen auf Rogosa-Agar. Dieses Medium hat damit eine breite Akzeptanz für die selektive Kultivierung der Laktobazillen [17, 23, 68, 112]. Weiterhin wurde beschrieben, dass in vielen natürlichen Umgebungen weniger als 1% der Mikroorganismen kultivierbar sind [79]. Gerade in der Lebensmittelindustrie existieren Laktobazillen, welche unter anaeroben Bedingungen auf Rogosa-Agar und 37°C nicht kultivierbar sind [24]. Es wurde auch nachgewiesen, dass bei anaeroben Proben die Bakterien der äußeren Schicht absterben und nur die Bakterien des Inneren der Proben angezüchtet werden können, wobei diese die Mehrzahl darstellen [66]. Daher war es in dieser Studie wichtig, ein etabliertes Medium zur Anzucht von biochemisch als Laktobazillus Art identifizierte Isolate zu nutzen, um diese Bakterien möglichst eindeutig zu bestimmen.

Ein spezifisch selektiver Nachweis von Laktobazillen ist nötig, um eine sichere Identifikation von diesen Bakterien zu erhalten [68]. In der Literatur ist der Hinweis zu finden, dass es trotz des spezifischen Rogosa-Agar zu einem Verlust von Phylotypen kommen kann, die nicht widerstandsfähig genug für den Anbau sind, und damit die Anzucht von nachzuweisenden Stämmen zu einer geringeren Anzahl von zu identifizierenden Arten führen kann. Doch ist der Kulturverlust auf Rogosa-Agar vernachlässigbar, da klinische Kulturproben zwar zum Verlust von Phylotypen auf dem Rogosa-Medium führen können, aber dafür die vor der Anzucht nicht so widerstandsfähigen Phylotypen, die nur in geringer Anzahl vorhanden sind, sich so vermehren und nachgewiesen werden können. Jedoch ist die Koloniemorphologie auf Rogosa-Agar bei der Differenzierung von Laktobazillen keine eindeutige Identifizierungsoption [112].

Um die Anwesenheit von unbemerkten oder in diesem Zusammenhang noch nicht charakterisierten Bakterien nachzuweisen, ist in dieser Studie eine 16S rRNA Analyse durchgeführt worden [69]. Diese Anwendungsmethodik ist eine häufig genutzte Kombination aus Kultur- und Klonierungstechnik zur genaueren und spezifischeren Analyse von Isolaten [13, 18, 54, 69, 75, 100, 112].

In einer vergleichenden Studie mit dieser Anwendungsmethodik wurden die konventionelle Anzucht und die Gen-Sequenzierung von Bakterien miteinander verglichen und starke Unterschiede festgestellt. In 17% der analysierten Isolate wurden gleiche Bakterien, in 55% die gleiche Gattung und in 16% keine Übereinstimmung festgestellt. Auch in der vorliegenden Studie konnte dies mit einem Prozentsatz von

32,3% einer anderen Gattung festgestellt werden. Damit wird verdeutlicht, dass die Sequenzierung von rRNA wesentlich spezifischer und genauer in der Identifikation von Isolaten ist als konventionelle Methoden [5]. Neben Laktobazillen konnten so auch andere Bakterien wie *S. sobrinus*, *P. denticolens*, *B. dentium* und weitere Actinobacteria auf diesem selektiven Medium entdeckt werden [97, 99, 112].

5.3 Identifizierung durch 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse

Verschiedene Studien zur mikrobiologischen Diagnostik weisen Unterschiede in den Inkubationszeiten und in der Bewertung der Analysen von Sequenzen auf. Deshalb werden neben einem Selektivmedium für eine exakte Bestimmung von Phylotypen spezifischere Nachweismethoden als die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse gefordert, da auch hier Unterschiede in der Identifizierung von fest definierten oralen Stämmen festgestellt wurden [51, 100]. Explizit führt die DNA-Sequenzierung zu einer genaueren Identifikation und zu einer größeren Vielfalt an nachgewiesenen Bakterien, deren Repräsentativität und die Phylogenie von verschiedenen bakteriellen Genomen und der Bakterienphylogenie bestätigt wurden, als auf konventionellen Nährmedien. Die Forderung von noch genaueren Methoden gilt eher für Staphylokokken und Burkholderia Arten. Mit der genutzten Methode konnte die Identifizierungsrate von ungewöhnlichen Bakterien von 65% - 83% auf >90% erhöht werden [5, 31, 71, 92]. In einer anderen Studie wurde die Erfolgsrate zur Bestimmung von anaeroben grampositiven Bakterien durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse im Vergleich zu konventionellen Methoden von 62% auf 92% erhöht [57]. Jedoch müssen für den Routineeinsatz der seit 1977 von Woese eingeführten Technik in der klinischen Mikrobiologie einheitliche Richtlinien für die Anwendung und Auswertung geschaffen werden [34, 107].

Die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse gilt als ausreichend wertvolles Werkzeug für die Differenzierung von oralen Bakterien der gleichen Art und Gattung [59, 107].

Die Anwendung von 16S rRNA Gen-Sequenzanalysen hat gezeigt, dass die bakterielle Beteiligung an der Entwicklung der Karies viel komplexer ist als angenommen und hat die Anwesenheit von vielen unbemerkten oder nicht charakterisierten Bakterien bewiesen [25, 69]. Dies wird auch durch die vorliegende Studie nochmals verdeutlicht. Dadurch ist ein Zusammenhang der derzeit definierten oralen Taxonomie und der 16S rRNA Taxonomie zum jetzigen Zeitpunkt unklar, obwohl circa 82% des oralen Mikrobioms nachweisbar sind, davon aber meist nur die gut kultivierbaren Arten.

Seltene Phylotypen sind noch nicht identifiziert und konventionell angezüchtete charakterisierte Bakterien oft fehlinterpretiert worden [29]. Seit der Einführung dieser Nachweismethode wurden über 215 neue Bakterienarten und 29 neue Gattungen beschrieben [107]. Die in dieser Studie verwendete auf MicroSeq 500 16S rRNA basierte Sequenzanalyse ist eine etablierte Methode und konnte in einer anderen Studie über 89% von klinisch signifikanten bakteriellen Isolaten mit mehrdeutigen biochemischen Profilen nachweisen [108].

Da es bei einigen wichtigen Gattungen auch „blinde-Flecken“ auf den erstellten Sequenzen gibt, in denen die 16S rRNA Sequenzierung nicht ausreichend diskriminierend für die Identifikation bestimmter Arten ist, werden bei diesen alternative Ziele untersucht. Zum Beispiel ist groEL oder HSp60 ein häufig verwendetes essentielles Gen außerhalb der 16S rRNA, das herangezogen werden kann [56, 109]. Es wurden auch DNA-Sonden-Methoden, Immunoassays und Mikromethoden entwickelt. Dabei werden zum Beispiel Enzyme als phänotypische Marker, um spezifische bakterielle Spezies zu identifizieren, genutzt [4]. Bei der DNA-Sonden-Methode werden DNA-Segmente oder Nukleotide der 16S rRNA, die einzigartig für jede Bakterienart sind, aus einem repräsentativen Stamm des Ziel-Bakteriums hergestellt und diese so spezifisch nachgewiesen [27]. Durch die PCR ist eine Erhöhung der Empfindlichkeit durch Replikation und Vermehrung der DNA oder RNA Fragmente möglich. Dadurch können unterrepräsentierte Stämme, die sonst verdrängt wurden, durch gezielte Klonierung identifiziert und auch unentdeckte Organismen bewiesen werden.

Bei den verschiedenen DNA-Sonden können auch Kreuzreaktionen mit genetisch verwandten Arten beobachtet werden, obwohl geklonte Sonden spezifischer als ganze genomische Sonden sind und auch eng verwandte Arten unterscheiden können sollten [100].

Bei den Immunoassays werden polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen Spezies spezifischer Oberflächen Antigene verwendet, um Ziel-Bakterien zu identifizieren. Doch auch hier kann es zu Kreuzreaktionen mit Antigen verwandten Arten kommen oder monoklonale Antikörper können so spezifisch sein, dass sie Stämme der gleichen Art auf Grund leicht unterschiedlicher Antigen präsentierender Epitope nicht erkennen [37].

Viele der zu untersuchenden Bakterien im oralen System haben einzigartige Kombinationen von Enzymen, welche durch eine Reihe von biochemischen Tests

nachgewiesen werden können, wobei auch hier viele Kreuzreaktionen auftreten und es so zu einer ungenauen Diagnostik kommt [91]. Ein Vorteil der enzymatischen Identifikation ist die kurze Inkubationszeit des Tests [61].

Viele Studien, wie auch die vorliegende Studie, verwenden zur Feststellung der oralen und dentalen Taxonomie die 16S rRNA als zuverlässiges Untersuchungswerkzeug und erhalten dadurch wichtige und neue Erkenntnisse, da eine zu starke Spezifikation der Untersuchungsmethodik die Entdeckung neuer Bakterien verhindern kann. Durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse ist eine 41-mal größere Erkennung von Anaerobier möglich als durch klassische Auszählung der Kolonien bei der Kultivierung auf Rogosa-Agar [69]. In einer anderen Studie ist die Entdeckung der doppelten Anzahl von Phylotypen beschrieben und mit der Genotypisierung eine noch größere Vielfalt nachgewiesen worden [68, 112]. Es kann durch diese Technik ein direkter Vergleich von Lebensgemeinschaften aus verschiedenen Proben gezogen werden [77]. So wird die 16S rRNA im oralen Mikrobiom zur Identifikation von oralen Isolaten, subgingivaler Plaque, Karies in bleibenden und Milchzähnen, Wurzelkaries, endodontischen Prozessen, dentoalveolären Abszessen, dem Nachweis oraler Bakterien im Blut, dem direkten Nachweis von Actinobacteria genutzt und es sind sogar neue Phylotypen entdeckt worden [1, 5, 7, 18, 20, 27, 28, 29, 32, 38, 52, 59, 67, 69, 72, 75, 76, 83, 85, 88, 96, 100, 112].

5.4 Basenanzahl, Similarity, Gen-Datenbanken

Zur Identifizierung eines Mikroorganismus werden in der Regel die Informationen von 500 Basen des 16S rRNA Gens genutzt, wie auch in dieser Studie angewendet, da dieser Bereich mehrere variable Regionen beinhaltet, wobei auf die 5' Region nicht verzichtet werden darf, weil diese für eine adäquate Identifikation von Bakterien benötigt wird [5, 7, 29, 77, 88, 100]. Für den Bau von Stammbäumen ist es wichtig, fast vollständige Sequenzen von 1500 Basen zu verwenden [1, 29, 65, 85]. Auch volle Sequenzen mit einer Abweichung von 1% können eine Mehrdeutigkeit des Bakteriums ausdrücken und eine andere Art darstellen [77].

Es ist eine unterschiedliche Auffassung der Similarity (Gleichheit von Sequenzen gegenüber Referenzsequenzen in Gen-Datenbanken) der Basenpaarsequenzen in der Literatur zu erkennen. Es werden Similaritys von 90%, >97%, >98%, 99% beschrieben, aber es wird empfohlen, eine Similarity von >99% und besser noch 99,5% zu

berücksichtigen, da schon eine Abweichung von $>0,5\%$ eine neue Art darstellen kann [1, 5, 29, 38, 45, 82, 95, 107].

In dieser Studie wurde bei den 68 Wildstämmen eine Similarity von 100% mit der Gen-Datenbank Blast erreicht und damit ein eindeutiges Ergebnis und Referenzen für weitere Forschungen geschaffen.

Die nützlichsten und oft verwendeten Gen-Datenbanken sind GenBank oder RDP-II, da hier vollständige Sequenzen gespeichert sind [1, 5, 7, 18, 28, 38, 59, 65, 85]. Der Ursprung der über 450000 Sequenzen von RDP-II ist die GenBank, die zu den Gen-Datenbanken mit den eindeutigsten Sequenzen gehört [107]. Neben den genannten Gen-Datenbanken gilt auch Blast als eine der zuverlässigen Gen-Datenbanken zur Identifizierung von Bakterien und wird häufig zur Auswertung von oralen 16S rRNA Sequenzen genutzt [5, 38, 75, 100]. Blast ist mit der HMD Gen-Datenbank (Human oral Mikrobiom Database) verknüpft und wird für orale Gensequenzen genutzt [29, 100]. In einer Referenzsequenzanalyse mit Blast wurde eine Similarity von 89,1% und bei der Kombination von Blast mit RDP-II eine Similarity von 96,8% mit den verwendeten Sequenzen und dem eindeutig definierten Mikroorganismus festgestellt [29]. In der vorliegenden Studie wurden die Referenzsequenzen der Datenbanken Blast, RDP-II und PBIL verwendet, um im Vergleich die eindeutigsten Ergebnisse zu erzielen, wovon Blast die spezifischsten Resultate mit 100% Similarity bei eindeutig identifizierten Phylotypen lieferte. In der Gesamtanzahl der geprüften Isolate konnte Blast 98,5% eindeutig identifizieren, da lediglich bei einem Isolat nur die Gattung als undefinierter Laktobazillus Stamm festgestellt wurde und es so in dieser Studie vielleicht zu der Entdeckung eines neuen Phylotypen gekommen ist. RDP-II und PBIL konnten trotz eindeutig identifizierten Sequenzen von Blast und einer 100% Similarity bei gleichen Sequenzen nur Similarity bei RDP-II von 93% bis 100% und bei PBIL von 90% bis 100% vergleichend berechnen. Beide Gen-Datenbanken hatten die größten Abweichungen bei phylogenetisch eng verwandten Bakterien, die der *L. casei* Gruppe angehören. Bei der Identifizierung sich in der gleichen phylogenetischen Gruppe befindlichen Bakterien *L. casei* und *L. rhamnosus* wurde bei Auswertungen mit der Gen-Datenbank Blast ein Unterschied der beiden Laktobazillus Arten in den Protein kodierenden Genen von 27% festgestellt [74]. Dieser Unterschied konnte durch die eindeutige Similarity von 100% mit der Gen-Datenbank Blast und den geprüften Isolaten nachvollzogen werden. In den zusätzlich genutzten Datenbanken wurde bei RDP-II in 17,6% und bei PBIL in 10,2% der Fälle kein eindeutiges Ergebnis und damit

keine Unterscheidung festgestellt. Allerdings konnten *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. oris*, *L. salivarius*, *L. vaginalis* aus verschiedenen Dentinproben in einer Studie des College of Dentistry der New York University durch RDP-II mit einer Similarity von 100% nachgewiesen werden [112].

5.5 Diskussion der Ergebnisse

Bei der Untersuchung grampositiver, stäbchenförmiger Bakterien mit einer Vancomycin-Resistenz und einer negativen Katalase-Reaktion aus tiefen kariösen Läsionen von Milchzähnen und der biochemischen Identifizierung als Laktobazillus Art ergaben sich große Unterschiede in den Ergebnissen der biochemischen Identifikation und der Identifizierung durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse. 69% der untersuchten Proben waren tatsächlich Laktobazillen. Es ist beschrieben, dass in fortgeschrittener Karies die Laktobazillen dominant werden und andere für die Progression von Karies verantwortlichen Bakterien verdrängen [18].

Dass die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse zu einer genaueren Identifikation und zu einer größeren Vielfalt an nachgewiesenen Bakterien führt, wird auch durch andere Studien deutlich [5, 75]. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass die derzeit definierte orale Taxonomie und die orale 16S rRNA Taxonomie unklar sind und noch nicht abschließend geklärt wurden [29]. Laktobazillen sind die am meisten nachgewiesenen Bakterien in tiefer Karies und dominieren diese [75, 38]. Sie gelten als sekundäre Eindringlinge in tiefer Karies und wandern erst nach einer tieferen Progression der Karies ein [64]. Dabei gehören *L. fermentum* und *L. gasseri* mit zu den Hauptvertretern der Laktobazillen in tiefer Karies [52, 75, 100]. Dies wird auch in der vorliegenden Studie deutlich, bei der *L. fermentum* mit 19,6% die am meisten vertretene Art der Laktobazillen ist. Auch *L. gasseri* mit einem Anteil von 17,4% ist einer der am häufigsten nachgewiesenen Laktobazillen in dieser Studie. *L. fermentum* und *L. gasseri* zählen auch in mehreren anderen Studien zu den häufigsten Isolaten aus kariösen Läsionen.

Die Hauptvertreter der Laktobazillen in kariösen Läsionen von Milchzähnen, wie z.B. *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. casei* und *L. paracasei* wechseln sich in den verschiedenen Studien in ihrer Position als Hauptvertreter ab, da sich die prozentuale Häufigkeit der Anwesenheit der Laktobazillen in den verschiedenen Studien stark unterscheidet [7, 38, 54, 67, 68, 100].

Die in dieser Studie nachgewiesene *L. casei* Gruppe hatte den größten Anteil der Laktobazillen mit 45,7% und besteht aus den Bakterien *L. rhamnosus* (n=8), *L. paracasei* (n=7), *L. casei* (n=5), *L. plantarum* (n=1). Vertreter der *L. casei* Gruppe gelten auch als Leitkeime tiefer kariöser Läsionen und sind auf Grund ihrer großen phylogenetischen Verwandtschaft oft nur als Gemeinschaft identifiziert worden [18, 33, 38, 85, 100, 112]. Durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse ist es möglich, Bakterien der *L. casei* Gruppe genauer zu unterscheiden. So stellen sich *L. rhamnosus*, *L. paracasei* und *L. casei* als Hauptvertreter dieser Gruppe dar [69, 75]. In einer Untersuchung kariöser Dentinproben von 14 Kindern wurde *L. casei* vor *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* als häufigster Vertreter der Laktobazillen genannt [68]. Es gibt aber auch Forschungsergebnisse, in denen einzelne Vertreter der genannten Keime im untersuchten Gesamtkeimspektrum nicht vorgefunden wurden.

Auch Laktobazillen der *L. reuteri* Gruppe wie *L. oris* (n=2), *L. vaginalis* (n=2) wurden in dieser als auch in anderen Studien nachgewiesen [112]. *L. vaginalis* ist ein Keim der normalen Mikroflora des vaginalen Epithels gesunder Frauen [44]. Des Weiteren wurde *L. rhamnosus* im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen [74, 104].

Die in dieser Studie gefundenen Laktobazillen wie *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. oris* und *L. vaginalis* stimmen als Vertreter tiefer Karies mit anderen Studien überein [16, 17, 18, 23, 75, 112]. In weiteren Studien sind auch andere Laktobazillus Arten, wie zum Beispiel *L. panis*, *L. buchneri*, *L. alimentarius*, *L. salivarius* mit tiefer Karies in Verbindung gebracht worden. In der vorliegenden Studie konnten die Laktobazillen *L. plantarum* und *L. gastricus* nachgewiesen werden [18, 54, 68, 112].

Die größten nachgewiesenen Gruppen in dieser Studie stellen die phylogenetische Gruppe der *L. casei* mit 45,7% und die Actinobacteria mit einem Gesamtanteil von 26% dar. Dieses wurde auch in einer anderen Studie mit tiefen kariösen Läsionen entdeckt. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Laktobazillen und Arten der Actinobacteria in tiefen kariösen Läsionen dominieren. Die Hauptvertreter der Actinobacteria sind *B. dentium*, *S. inopinata* und *P. denticolens* [13, 38, 67].

Actinobacteria wurden fast ausschließlich nur in tiefer Karies gefunden [85]. Der in dieser Studie gefundene *O. profusa* mit einem Gesamtanteil von 1% wurde auch in subgingivaler Plaque, Wurzelkaries, endodontischen Infektionen und nekrotisierender Gingivitis ulcerosa nachgewiesen [28, 85, 86, 88].

Neue PCR Techniken und 16S rRNA Gen-Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die bakterielle Beteiligung an der Entwicklung der Karies viel komplexer ist, als bislang angenommen wurde und nicht einzelne Laktobazillus Arten mit tiefen kariösen Läsionen assoziiert werden können [25].

In einer vergleichbaren Studie mit 42 Kindern und Proben aus tief zerstörten kariösen Zähnen, bei denen die anaeroben kultivierbaren Bakterien untersucht wurden, waren die häufigsten Erreger *P. denticolens*, *S. sobrinus*, *B. dentium* und *L. gasseri* [100]. Diese Studie ähnelt sich in den Ergebnissen einer weiteren Studie mit 30 Kindern, bei denen Proben aus kariösem Dentin entnommen wurden, auch hier sind die Haupterreger Actinobacteria und die zu dem Stamm gehörenden Bifidobakterien nachgewiesen worden [7]. Diese Forschungsergebnisse sind mit der vorliegenden Studie jedoch nicht in jedem Punkt vergleichbar, da hier ausschließlich mit vorausgewählten, biochemisch als Laktobazillen identifizierten Isolaten gearbeitet wurde. Umso erstaunlicher ist es, dass in dieser Studie mit Hilfe der 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse fast 32,3% andere Bakterienarten wie Actinobacteria und den dazugehörigen Bifidobakterien oder auch *S. sobrinus* nachgewiesen werden konnten. Grundsätzlich ist der hohe prozentuale Anteil der Actinobacteria mit 27,9% gegenüber den anderen Studien sehr ähnlich [7, 100]. Bereits in älteren Studien wurde auf die Anwesenheit von Actinobacteria hingewiesen [33, 39]. Dies bedeutet, dass durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse Bakterien, welche in der Regel in kultivierbaren Studien als untergeordnete Komponente dargestellt wurden, nun als putative Krankheitserreger mit einer großen Rolle angesehen werden müssen [83].

Es ist beschrieben, dass Actinobacteria und Bifidobakterien eine Bedeutung in der Kariesentwicklung und dass Patienten mit tiefen kariösen Läsionen und *S. mutans* Nachweis ein deutlich erhöhtes Niveau an Actinobacteria und Laktobazillus Arten haben. Bei den Patienten ohne *S. mutans* Nachweis und tiefen kariösen Läsionen wurde eine erhöhte Anzahl von Actinobacteria mit dem Hauptvertreter *B. dentium* nachgewiesen. Die Anzahl der *S. mutans* verringerte sich mit der Anwesenheit von Actinobacteria [1, 7, 33, 72, 75]. In der vorliegenden Studie wird die Annahme einer hohen Anzahl von Actinobacteria durch eine Beteiligung von 27,9% der Actinobacteria deutlich, wobei *Sc. inopinata* mit 11%, *B. dentium* mit 8%, *P. denticolens* mit 6% und *O. profusa* mit 1% vertreten waren.

Die 3 nachgewiesenen Hauptvertreter der Actinobacteria gelten auch in anderen Studien als sogenannte Leitkeime in tiefen kariösen Läsionen. Bifidobakterien konnten

ebenfalls zu 95% im Speichel nachgewiesen werden und sind wie *O. profusa* in Wurzelkaries entdeckt worden [10, 22, 42, 43, 67, 73].

Sc. wiggisiae wird in einer Studie deutlich mit frühkindlicher Karies in Zusammenhang gebracht. Dieses Bakterium konnte in der vorliegenden Studie nicht identifiziert werden, jedoch die Häufung von *P. denticolens* und *B. dentium* wurde bestätigt [100]. Diese Bakterien, wie auch *S. sobrinus*, wurden fast ausschließlich auf saurem Medium und unter anaeroben Bedingungen angezüchtet [97, 99]. *S. sobrinus* hatte in der vorliegenden Studie einen Anteil von 4% der nachgewiesenen Bakterien und ist in einer anderen Studie bei Kindern mit keiner, mittlerer und hoher Kariesaktivität nachgewiesen worden [48]. Dieses Bakterium gilt als sehr schlecht nachweisbar, da es genetisch eng mit *S. mutans* verwandt, jedoch durch die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse gut identifizierbar ist [7, 100].

5.6 Schlussfolgerungen

Die in dieser Studie durchgeführte 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse bestätigt die Annahme, dass *L. fermentum*, *L. gasseri* und die Laktobazillus Arten der phylogenetischen *L. casei* Gruppe, wie *L. casei*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* die häufigsten Vertreter der grampositiven, stäbchenförmigen Bakterien mit negativer Katalase-Reaktion und Vancomycin-Resistenz in Dentinproben profunder Milchzahnläsionen sind.

Des Weiteren ist die Anwesenheit der Actinobacteria, insbesondere von *Sc. inopinata*, *B. dentium* und *P. denticolens* in diesen Läsionen nachgewiesen worden.

Diese Studie gibt Anhalt dafür, dass viele Isolate durch qualitativ-mikrobiologische Analysen in früheren Studien fehlinterpretiert wurden und biochemisch als Laktobazillus Arten identifizierte Bakterien auch anderen Stämmen zuzuordnen sind.

Die 16S rRNA Gen-Sequenzanalyse kann als zuverlässiges Werkzeug in Kombination mit der Gen-Datenbank Blast für die Identifikation von Isolaten aus kariösen Läsionen genutzt werden.

6 Zusammenfassung

Die genaue taxonomische Identifikation von Bakterien in kariös verändertem Dentin führt zu einem besseren Verständnis der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft kariöser Läsionen.

Ziel dieser klinischen Untersuchung war die exakte Identifizierung von voruntersuchten Wildstämmen tiefer kariöser Läsionen aus Milchzahnkaries, die durch biochemische Analysen als Laktobazillus gekennzeichnet wurden.

Zur Auswertung konnten 68 Wildstämme molekularbiologisch analysiert werden. Aus den Isolaten wurden Reinkulturen gezüchtet und eine 16S rRNA Gen-Sequenzierung durchgeführt. Abschließend erfolgte die Charakterisierung der Bakterien anhand der gewonnenen Sequenzen im Vergleich mit den Gen-Datenbanken Blast, PBIL und RDP-II. Hierbei entsprachen 67,6% tatsächlich Laktobazillus Arten (n=46), 27,9% Actinobacteria (n=19) und 4,4% *S. sobrinus* (n=3). Die am häufigsten vertretenen Bakterien waren zu 13,2% *L. fermentum* (n=9), 11,8% *L. rhamnosus* (n=8), 11,8% *L. gasseri* (n=8), 11,8% *Sc. Inopinata* (n=8). Weitere nachgewiesene Bakterien waren *L. paracasei* (n=7), *B. dentium* (n=6), *L. casei* (n=5), *P. denticolens* (n=4), *S. sobrinus* (n=3), *L. oris* (n=2), *L. vaginalis* (n=2), *L. plantarum* (n=1), *L. reuteri* (n=1), *L. parabuchneri* (n=1), *L. gastricus* (n=1), *O. profusa* (n=1) und eine undefinierte Laktobacillus Art.

Mit den Gen-Datenbanken Blast und RDP-II konnten die 16S rRNA Gen-Sequenzen mit durchschnittlich 500 bp am eindeutigsten identifiziert werden und lieferten die genauesten Ergebnisse. Mit Blast wurde eine Similarity von 100% erreicht, mit RDP-II eine Similarity von 93% - 100%, wobei die größten Unterschiede in phylogenetisch eng zusammenliegenden Arten auftraten. Jedem Isolat wurde eine Accession Number zugeordnet, welche mittlerweile als Referenzstamm in der Gen-Datenbank Blast veröffentlicht wurde.

Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass neben den Laktobazillen auch den Actinobacteria ein hoher Stellenwert in der Dentinkaries eingeräumt werden sollte und diese in früheren Studien möglicherweise oft unterbewertet wurden. Hingegen sind biochemische Analysen zur Bestimmung der mikrobiologischen Zusammensetzung tiefer Karies nicht aussagekräftig und spiegeln nicht die tatsächliche mikrobiologische Vielfalt der Dentinkaries wieder.

L. fermentum, *L. gasseri* und die Bakterien der *L. casei* Gruppe konnten als Hauptvertreter der Laktobazillen in tiefen kariösen Läsionen bestätigt werden.

In der grampositiven, anaeroben Mikroflora muss *Sc. inopinata* auf Grund seines hohen Vorkommens als einer der Hauptkeime in tiefen Dentinläsionen bei Milchzähnen angesehen werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Aas JA, Griffen AL (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46(4): 1407-17.
2. Amann RI, Ludwig W (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59(1): 143-69.
3. Awano S, Ansai T (2008). Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. *J Dent Res* 87(4): 334-9.
4. Baehni PC, Guggenheim B (1996). Potential of diagnostic microbiology for treatment and prognosis of dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 7(3): 259-77.
5. Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ (2008). Identification of oral bacteria in blood cultures by conventional versus molecular methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105(6): 720-4.
6. Beck JD, Offenbacher S (2005). Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 76(11 Suppl): 2089-100.
7. Becker MR, Paster BJ (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40(3): 1001-9.
8. Bergey's (1986). *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Gram-positive Bacteria other than Actinomycetes. Baltimore, Hong Kong, London: William & Wilkins
9. Beighton D (2005). The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 33(4): 248-55.
10. Beighton D, Gilbert SC (2008). Isolation and identification of bifidobacteriaceae from human saliva. *Appl Environ Microbiol* 74(20): 6457-60.
11. Berbari EF, Cockerill FR (1997). Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. *Mayo Clin Proc* 72(6): 532-42.
12. Bernardeau M, Guguen M (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol Rev* 30(4): 487-513.
13. Bjorndal L, Larsen T (2000). Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res* 34(6): 502-8.

14. Bowden GH (1997). Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? *Community Dent Oral Epidemiol* 25(1): 76-81.
15. Bradshaw DJ, Marsh PD (1998). Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res* 32:456-462.
16. Byun R, Nadkarni MA (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* 42(7): 3128-36.
17. Caufield PW, Li Y (2007). Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Res* 41(1): 2-8.
18. Chhour KL, Nadkarni MA (2005). Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 43(2): 843-9.
19. Clarke JK (1924). On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol* 5: 141-147.
20. Corby PM, Bretz WA (2007). Heritability of oral microbial species in caries-active and caries-free twins. *Twin Res Hum Genet* 10(6): 821-8.
21. Corby PM, Lyons-Weiler J (2005). Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol* 43(11): 5753-9.
22. Crociani F, Biavati B (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int J Syst Bacteriol* 46(2): 564-71.
23. Dal Bello F, Hertel C (2006). Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Syst Appl Microbiol* 29(1): 69-76.
24. Dal Bello F, Walter J (2003). Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microb Ecol* 45(4): 455-63.
25. Davey ME, O'Toole A (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 847-67.
26. de Soet JJ, Weerheijm KL (1995). A comparison of the microbial flora in carious dentine of clinically detectable and undetectable occlusal lesions. *Caries Res* 29(1): 46-9.
27. Dewhirst FE, Paster BJ (1991). DNA probe analyses for the detection of periodontopathic bacteria in clinical samples. Quintessence Publishing Co., Ltd., pp.367-378.
28. Dewhirst FE, Paster BJ (2001). Characterization of novel human oral isolates and cloned 16S rDNA sequences that fall in the family

- Coriobacteriaceae: description of *Olsenella* gen. nov., reclassification of *Lactobacillus uli* as *Olsenella uli* comb. nov. and description of *Olsenella profusa* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 5): 1797-804.
29. Dewhirst FE, Chen T (2010) The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192(19): 5002-17.
 30. Dodman T, Robson J (2000). *Kingella kingae* infections in children. *J Paediatr Child Health* 36(1): 87-90.
 31. Drancourt M, Bollet C (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38(10): 3623-30.
 32. Dymock D, Weightman AJ (1996). Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol* 34(3): 537-42.
 33. Fusayama T (1979). Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent* 4(2): 63-70.
 34. Fox GE, Magrum LJ (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(10): 4537-41.
 35. Geer LY, Domrachev M (2002). CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res* 12(10): 1619-23.
 36. Genco RJ, Grossi SG (2005). A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol* 76(11 Suppl): 2075-84.
 37. Gmür R (1995). Value of new serological probes for the study of putative periodontal pathogens. 1st ed. Chicago: Quintessence Publishing Co., Inc.
 38. Gross EL, Leys EJ (2010) Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol* 48(11): 4121-8.
 39. Hahn CL, Falkler WA (1991). Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *Arch Oral Biol* 36(2): 147-53.
 40. Harmsen D, Rothganger J (1999). Intuitive hypertext-based molecular identification of micro-organisms. *Lancet* 353(9149): 291.
 41. Harty DW, Oakey HJ (1994). Pathogenic potential of lactobacilli. *Int J Food Microbiol* 24(1-2): 179-89.
 42. Hoshino E (1985). Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res* 64(10): 1195-8.

43. Huys G, Vancanneyt M (2007). *Alloscardovia omnicoles* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 7): 1442-6.
44. Hyman RW, Fukushima M (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(22): 7952-7.
45. Janda JM, Abbott SL (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45(9): 2761-4.
46. Jenkinson HF, Lamont RJ (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 13(12): 589-95.
47. Jian W, Zhu L (2001). New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 5): 1633-8.
48. Jiang W, Jiang Y (2011). Investigation of supragingival plaque microbiota in different caries status of Chinese preschool children by denaturing gradient gel electrophoresis. *Microb Ecol* 61(2): 342-52.
49. Joshipura KJ, Hung HC (2003). Periodontal disease, tooth loss, and incidence of ischemic stroke. *Stroke* 34(1): 47-52.
50. Joshipura KJ, Rimm EB (1996). Poor oral health and coronary heart disease. *J Dent Res* 75(9): 1631-6.
51. Kanasi E, Dewhirst FE (2010) Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res* 44(5): 485-97.
52. Kanasi E, Johansson I (2010) Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *J Dent Res* 89(4): 378-83.
53. Keijser BJ, Zaura E (2008). Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 87(11): 1016-20.
54. Kneist S, Schmidt F (2010) Diversity of *Lactobacillus* species in deep carious lesions of primary molars. *Eur Arch Paediatr Dent* 11(4): 181-6.
55. Krasse B (1988). Biological factors as indicators of future caries. *Int Dent J* 38(4): 219-25.
56. Kwok AY, Chow AW (2003). Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 1): 87-92.
57. Lau SK, Ng KH (2006). Usefulness of the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system for identification of anaerobic Gram positive bacilli isolated from blood cultures. *J Clin Pathol* 59(2): 219-22.

58. Lederberg J, Mc Cray AT (2001). 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words *The Scientist* 15(7): 8.
59. Li Y, Ge Y (2007). Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol* 45(1): 81-7.
60. Li Y, Ku CY (2005). Survey of oral microbial diversity using PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis. *J Dent Res* 84(6): 559-64.
61. Loesche WJ (1986). The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiol Immunol* 1(1): 65-72.
62. Loesche WJ, Lopatin DE (1992). Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 30(2): 427-33.
63. Loesche WJ, Syed SA (1973). The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine. *Caries Res* 7(3): 201-16.
64. Love RM, Jenkinson HF (2002). Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(2): 171-83.
65. Maidak BL, Cole JR (2000). The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res* 28(1): 173-4.
66. Manganiello AD, Socransky SS (1977). Attempts to increase viable count recovery of human supragingival dental plaque. *J Periodontal Res* 12(2): 107-19.
67. Mantzourani M, Gilbert SC (2009). The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 43(4): 308-13.
68. Marchant S, Brailsford SR (2001). The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res* 35(6): 397-406.
69. Martin FE, Nadkarni MA (2002). Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 40(5): 1698-704.
70. McGinnis S, Madden TL (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue): W20-5.
71. Mignard S, Flandrois JP (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods* 67(3): 574-81.

72. Miyake T, Watanabe K (1998). Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol Immunol* 42(10): 661-7.
73. Modesto M, Biavati B (2006). Occurrence of the family bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res* 40(3): 271-6.
74. Morita H, Toh H (2009). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *J Bacteriol* 191(24): 7630-1.
75. Munson MA, Banerjee A (2004). Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 42(7): 3023-9.
76. Munson MA, Pitt-Ford T (2002). Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 81(11): 761-6.
77. Muyzer G, de Waal EC (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59(3): 695-700.
78. Offenbacher S, Jared HL (1998). Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol* 3(1): 233-50.
79. Olsen GJ, Lane DJ (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 40: 337-65.
80. Oelfke MS (2003). Untersuchung zur Veränderung der Mikroflora in tiefen kariösen Läsionen nach Applikation antimikrobieller Substanzen. Medizinische Zentralbibliothek: Köln
81. Orhan AI, Oz FT (2008). A clinical and microbiological comparative study of deep carious lesion treatment in deciduous and young permanent molars. *Clin Oral Investig* 12(4): 369-78.
82. Palys T, Nakamura LK (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* 47(4): 1145-56.
83. Paster BJ, Boches SK (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183(12): 3770-83.
84. Paster BJ, Dewhirst FE (2009). Molecular microbial diagnosis. *Periodontol* 2000 51: 38-44.
85. Preza D, Olsen I (2008). Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* 46(6): 2015-21.

86. Rocas IN, Siqueira JF (2005). Species-directed 16S rRNA gene nested PCR detection of *Olsenella* species in association with endodontic diseases. *Lett Appl Microbiol* 41(1): 12-6.
87. Rogosa M, Mitchell JA (1951). A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J Dent Res* 30(5): 682-9.
88. Sakamoto M, Rocas IN (2006). Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 21(2): 112-22.
89. Seymour GJ, Ford PJ (2007). Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 13 Suppl 4: 3-10.
90. Simark-Mattsson C, Emilson CG (2007). Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci* 115(4): 308-14.
91. Slots J (1981). Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system. *J Clin Microbiol* 14(3): 288-94.
92. Snel B, Bork P (1999). Genome phylogeny based on gene content. *Nat Genet* 21(1): 108-10.
93. Socransky SS, Gibbons RJ (1963). The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch Oral Biol* 8: 275-80.
94. Songjinda P, Nakayama J (2005). Molecular monitoring of the developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(3): 638-41.
95. Stackebrandt E, Goebel BM (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.
96. Strahinic I, Busarcevic M (2007). Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiol Immunol* 22(2): 111-7.
97. Svensater G, Borgstrom M (2003). The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res* 37(6): 395-403.
98. Takahashi N, Nyvad B (2011). The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *J Dent Res* 90(3): 294-303.
99. Tanabe Y, Park JH (2006). Comparison of chairside microbiological screening systems and conventional selective media in children with and without visible dental caries. *Pediatr Dent* 28(4): 363-8.

100. Tanner AC, Mathney JM (2011). Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J Clin Microbiol* 49(4): 1464-74.
101. Tanzer JM, Livingston J (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 65(10): 1028-37.
102. Tinanoff N, O'Sullivan DM (1997). Early childhood caries: overview and recent findings. *Pediatr Dent* 19(1): 12-6.
103. van Houte J (1994). Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 73(3): 672-81.
104. Ventura M, Turrone F (2009). The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genet* 5(12): e1000785.
105. Weisburg WG, Barns SM (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173(2): 697-703.
106. Wilson M, Weightman J, Wade WG (1997). Applications of molecular ecology in the characterization of uncultured microorganisms associated with human disease. *Rev. Med. Microbiol.* 8(2): 91-102.
107. Woo PC, Lau SK (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 14(10): 908-34.
108. Woo PC, Ng KH (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol* 41(5): 1996-2001.
109. Woo PC, Woo GK (2002). Single gene target bacterial identification. *groEL* gene sequencing for discriminating clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44(2): 143-9.
110. Wu T, Trevisan M (2000). Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. *Arch Intern Med* 160(18): 2749-55.
111. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD (2000). Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 27: 722-732
112. Yang R, Argimon S (2011). Determining the genetic diversity of lactobacilli from the oral cavity. *J Microbiol Methods* 82(2): 163-9.

8 Anhang

8.1 Materialliste

Rogosa-Agar:	Bacto Trypton	10,0 g
	Bacto Hefeextrakt	5,0 g
	Bacto Dextrose	10,0 g
	Bacto arabinose	5,0 g
	Bacto Saccharose	5,0 g
	Natriumacetat	15,0 g
	Ammoniumcitrat	2,0 g
	Monokaliumphosphat	6,0 g
	Magnesiumsulfat	0,57 g
	Mangansulfat	0,12 g
	Eisensulfat	0,03 g
	Sorbitonmonooleat	1,0 g
	Bacto Agar	15,0 g
	Essigsäure	1,3 ml/L
	pH-Wert	5,4

8.2 Tabellen der Ergebnisse

Laktobazillus Arten	Parascardovia denticolens	Bifidobakterium dentium	Scardovia inopinata	Streptokokkus sobrinus	Olsenella profusa
n = 46	n = 4	n = 6	n = 8	n = 3	n = 1
67,6%	5,9%	8,8%	11,7%	4,4%	1,6%

Tab. 2: Darstellung der identifizierten Isolate nach Anzahl (n =) und prozentualem Anteil

Kind-Nr.	Art	Accession Number	Blast	Blast%	RDP-II	RDP-II%	PBIL	PBIL%	Grampräparat	Katalase Eigenschaft	Vancomycin Test 5µg	Vancomycin Test 30µg
26-137	1. L.rhamnosus	HQ697604	L. rhamnosus	100	L. rhamnosus	99	L. rhamnosus	99	+ Stäbchen	-		-
28-140	2. L.fermentum	HQ697605	L. fermentum	100	L. fermentum	94,7	L. fermentum	95	+ Stäbchen	-		-
28-141	3. L.paracasei	HQ697606	L. paracasei	100	L.casei / L.paracasei/L.remanqilfy	98,2	L. paracasei	99	+ Stäbchen	-		-
28-142	4. L.reuteri	HQ697607	L. reuteri	100	L. reuteri	100	L. reuteri	99	+ Stäbchen	-		-
29-144	5. L.fermentum	HQ697608	L. fermentum	100	L. fermentum	99,3	L. fermentum	99	+ Stäbchen	-		-
29-146	6. L.gasseri	HQ697609	L. gasseri	100	L. gasseri	98,5	L. gasseri	99	+ Stäbchen	-	26	34
29-147	7. Parascardovia denticolens	HQ697610	P. denticolens	100	P. denticolens	97,5	P. denticolens	99	+ Stäb./kok.	-	10	14
29-148	8. L.gasseri	HQ697611	L. gasseri	100	L. gasseri	100	L. gasseri	99	+ Stäbchen	-	18	26
30-149	9. L.casei	HQ697612	L. casei	100	L.casei / L.paracasei/L.remanqilfy	97	L. paracasei	99	+ Stäbchen	-		-

Kind-Nr.	Art	Accession Number	Blast	Blast%	RDP-II	RDP-II%	PBIL	PBIL%	Grampräparat	Katalase Eigenschaft	Vancomycin Test 5µg	Vancomycin Test 30µg
31-150	10. <i>L.gasseri</i>	HQ697613	<i>L. gasseri</i>	100	<i>L. gasseri</i>	97,8	<i>L. gasseri</i>	98	+ Stäbchen	-	28	33
31-151	11. <i>L.fermentum</i>	HQ697614	<i>L. fermentum</i>	100	<i>L. fermentum</i>	98,9	<i>L. fermentum</i>	99	+ Stäb./kok.	-		-
31-152	12. <i>L.gasseri</i>	HQ697615	<i>L. gasseri</i>	100	<i>L. gasseri</i>	98	<i>L. gasseri</i>	99	+ Stäbchen	-	18	27
31-153	13. <i>L.fermentum</i>	HQ697616	<i>L. fermentum</i>	100	<i>L. fermentum</i>	100	<i>L. fermentum</i>	99	+ Stäbchen	-		-
32-154	14. <i>L.gastricus</i>	HQ697617	<i>L. gastricus</i>	100	<i>L. gastricus</i>	93,6	<i>L. gastricus</i>	95	+ Stäb./kok.	-		-
32-155	15. <i>L.oris</i>	HQ697618	<i>L. oris</i>	100	<i>L. oris</i>	97,1	<i>L. oris</i>	99	+ Stäbchen	-		-
33-156	16. <i>L.casei</i>	HQ697619	<i>L. casei</i>	100	<i>L.casei</i> / <i>L.paracasei</i> / <i>L.remanqilly</i>	99,8	<i>L.casei</i> / <i>L.paracasei</i>	99	+ Stäbchen	-		-
32-157	17. <i>Scardovia inopinata</i>	HQ697620	<i>S. inopinata</i>	100	<i>S. inopinata</i>	99,8	<i>S. inopinata</i>	99	+ Stäbchen	-	-	20
33-159	18. <i>L.fermentum</i>	HQ697621	<i>L. fermentum</i>	100	<i>L. fermentum</i>	96,5	<i>L. fermentum</i>	95	+ Stäbchen	-		-
34-160	19. <i>L.rhamnosus</i>	HQ697622	<i>L. rhamnosus</i>	100	<i>L. rhamnosus</i>	98,4	<i>L. rhamnosus</i>	99	+ Stäbchen	-		-
34-161	20. <i>L.plantarum</i>	HQ697623	<i>L. plantarum</i>	100	<i>L. plantarum</i>	99,8	<i>L. plantarum</i>	99	+ Stäb./kok.	-		-
34-162	21. <i>Bifidobacterium dentium</i>	HQ697624	<i>B. dentium</i>	100	Genus <i>Bifidobacterium</i>	96,9	<i>B. dentium</i>	95	+ Stäbchen	nicht eindeutig		25
35-164	22. <i>L.rhamnosus</i>	HQ697625	<i>L. rhamnosus</i>	100	<i>L. rhamnosus</i>	97,7	<i>L. rhamnosus</i>	99	+ Stäbchen	-		-
35-165	23. <i>Streptococcus sobrinus</i>	HQ697626	<i>S. sobrinus</i>	100	<i>S. sobrinus</i>	98,5	<i>S. sobrinus</i>	99	+ Stäbchen	-	15	18
36-168	24. <i>L.gasseri</i>	HQ697627	<i>L. gasseri</i>	100	<i>L. gasseri</i>	96,1	<i>L. gasseri</i>	99	+ Stäbchen	-	21	27
36-169	25. <i>Scardovia inopinata</i>	HQ697628	<i>S. inopinata</i>	100	<i>S. inopinata</i>	96,9	<i>S. inopinata</i>	95	+ Stäbchen	-		-
37-171	26. <i>Scardovia inopinata</i>	HQ697629	<i>S. inopinata</i>	100	<i>S. inopinata</i>	94,5	<i>S. inopinata</i>	95	+ Stäbchen	-		-
37-172	27. <i>Parascardovia denticolens</i>	HQ697630	<i>P. denticolens</i>	100	<i>P. denticolens</i>	93,6	<i>P. denticolens</i>	95	+ Stäbchen	-		-
37-173	28. <i>L.gasseri</i>	HQ697631	<i>L. gasseri</i>	100	<i>L. gasseri</i>	96,7	<i>L. gasseri</i>	98	+ Stäbchen	-	13	23
37-177	29. <i>Bifidobacterium dentium</i>	HQ697632	<i>B. dentium</i>	100	<i>B. dentium</i>	93,7	<i>B. dentium</i>	90	+ Stäbchen	-	22	29

Kind-Nr.	Art	Accession Number	Blast	Blast%	RDP-II	RDP-II%	PBIL	PBIL%	Grampräparat	Katalase Eigenschaft	Vancomycin Test 5µg	Vancomycin Test 30µg
38-179	30. L.paracasei	HQ697633	L. paracasei	100	L. paracasei	98,2	L. paracasei	99	+ Stäbchen	-		-
38-180	31. L.rhamnosus	HQ697635	L. rhamnosus	100	L. rhamnosus	99,6	L. rhamnosus	99	+ Stäbchen	-		-
39-183	32. L.fermentum	HQ697636	L. fermentum	100	L. fermentum	98,9	L. fermentum	99	+ Stäbchen	-		-
39-184	33. Scardovia inopinata	HQ697637	S. inopinata	100	S. inopinata	95,3	S. inopinata	95	+ Stäbchen	-		-
39-185	34. Bifidobacterium dentium	HQ697638	B. dentium	100	B. dentium	94,1	B. dentium	95	+ Stäbchen	-	36	43
41-189	35. L.casei	HQ697639	L. casei	100	L. rennankilfy	95,2	L. casei/ L. paracasei	95	+ Stäbchen	-		-
42-191	36. L.rhamnosus	HQ697640	L. rhamnosus	100	L. rhamnosus	98,7	L. rhamnosus	99	+ Stäbchen	-		-
42-192	37. L.gasseri	HQ697641	L. gasseri	100	L. gasseri	98,1	L. gasseri	99	+ Stäbchen	-		28
42-194	38. Bifidobacterium dentium	HQ697642	B. dentium	100	Bifidobacterium	95,7	B. dentium	99	+ Stäb./kok.	-	22	27
43-196	39. L.rhamnosus	HQ697643	L. rhamnosus	100	L. rhamnosus	96,7	L. rhamnosus	99	+ Stäbchen	-	-	-
43-197	40. L.casei	HQ697644	L. casei	100	L. rennankilfy	99,6	L. paracasei	99	+ Stäb./kok.	-		-
43-198	41. L.paracasei	HQ697645	L. paracasei	100	L. paracasei	98,9	L. paracasei	99	+ Stäb./kok.	-		-
44-201	42. Parascardovia denticolens	HQ697646	P. denticolens	100	P. denticolens	94,7	P. denticolens	99	rosa Stb. + blauem Gra.	-	24	30
44-203	43. Bifidobacterium dentium	HQ697647	B. dentium	100	B. dentium	92,5	B. dentium	95	+ Stäb./kok.	-	22	27
45-204	44. Olsenella profusa	HQ697648	O. profusa	100	Genus Olsenella	97,4	O. profusa	95	+ Stäbchen	-	22	31
45-205	45. Scardovia inopinata	HQ697649	S. inopinata	100	S. inopinata	96,7	S. inopinata	99	+ Stäb./kok.	-		-
45-206	46. Streptococcus sobrinus	HQ697650	S. sobrinus	100	S. sobrinus	97,4	S. sobrinus	99	+ Stäb./kok.	-	15	21
46-209	47. L.gasseri	HQ697651	L. gasseri	100	L. gasseri	95	L. gasseri	99	+ Stäbchen	-	20	26
46-210	48. L.fermentum	HQ697652	L. fermentum	100	L. fermentum	97,7	L. fermentum	99	+ Stäb./kok.	-	-	7

Kind-Nr.	Art	Accession Number	Blast	Blast%	RDP-II	RDP-II%	PBIL	PBIL%	Grampräparat	Katalase Eigenschaft	Vancomycin Test 5µg	Vancomycin Test 30µg
46-211	49. <i>L. spec.</i>	HQ697653	<i>L. spec.</i>	100	<i>L. spec.</i>	96,2	<i>L. ultunensis</i>	95	+ Fäden			-
46-212	50. <i>L. vaginalis</i>	HQ697654	<i>L. vaginalis</i>	100	<i>L. vaginalis</i>	97,2	<i>L. vaginalis</i>	98	+ Fäden	-	22	22
46-213	51. <i>L. paracasei</i>	HQ697655	<i>L. paracasei</i>	100	<i>L. casei / L. paracasei / L. rennanaqilfy</i>	96,7	<i>L. casei</i>	99	+ Stäbchen	-	-	-
46-214	52. <i>L. paracasei</i>	HQ697656	<i>L. paracasei</i>	100	<i>L. casei / L. paracasei / L. rennanaqilfy</i>	99,4	<i>L. paracasei</i>	99	+ Stäbchen	-	12	19
46-215	53. <i>L. paracasei</i>	HQ697657	<i>L. paracasei</i>	100	<i>L. casei / L. paracasei / L. rennanaqilfy</i>	99,1	<i>L. paracasei</i>	99	+ Stäb./kok.	-	-	-
46-216	54. <i>Parascardovia denticolens</i>	HQ697658	<i>P. denticolens</i>	100	<i>P. denticolens</i>	93	<i>P. denticolens</i>	90	+ Stäb./kok.	-	27	37
47-217	55. <i>L. rhamnosus</i>	HQ697659	<i>L. rhamnosus</i>	100	<i>L. rhamnosus</i>	96,9	<i>L. rhamnosus</i>	99	+ Stäbchen	-	-	-
47-218	56. <i>L. fermentum</i>	HQ697660	<i>L. fermentum</i>	100	<i>L. fermentum</i>	97,9	<i>L. fermentum</i>	99	+ Stäb./kok.	-	-	8
47-219	57. <i>L. oris</i>	HQ697661	<i>L. oris</i>	100	<i>L. oris</i>	98,9	<i>L. oris</i>	99	+ Stäbchen	-	-	-
47-220	58. <i>L. rhamnosus</i>	HQ697662	<i>L. rhamnosus</i>	100	<i>L. rhamnosus</i>	96,2	<i>L. rhamnosus</i>	98	+ Stäbchen	-	-	-
47-221	59. <i>Streptococcus sobrinus</i>	HQ697663	<i>S. sobrinus</i>	100	<i>S. sobrinus</i>	96,1	<i>S. sobrinus</i>	99	+ Stäb./kok.	-	20	25
48-228	60. <i>L. fermentum</i>	HQ697664	<i>L. fermentum</i>	100	<i>L. fermentum</i>	98,5	<i>L. fermentum</i>	99	+ Stäbchen	-	-	-
48-229	61. <i>L. casei</i>	HQ697665	<i>L. casei</i>	100	<i>L. casei / L. paracasei / L. rennanaqilfy</i>	96,5	<i>L. paracasei / L. casei</i>	99	+ Stäbchen	-	-	-
48-230	62. <i>Scardovia inopinata</i>	HQ697666	<i>S. inopinata</i>	100	<i>S. inopinata</i>	98,4	<i>S. inopinata</i>	99	+ Stäbchen	-	15	20
48-231	63. <i>L. vaginalis</i>	HQ697667	<i>L. vaginalis</i>	100	<i>L. vaginalis</i>	92,3	<i>L. vaginalis</i>	90	+ Stäbchen	-	-	8
49-236	64. <i>Scardovia inopinata</i>	HQ697668	<i>S. inopinata</i>	100	<i>S. inopinata</i>	98,1	<i>S. inopinata</i>	99	+ Stäbchen	-	-	-
49-238	65. <i>Scardovia inopinata</i>	HQ697669	<i>S. inopinata</i>	100	<i>S. inopinata</i>	97,3	<i>S. inopinata</i>	99	+ Stäb./kok.	-	-	-
49-240	66. <i>Bifidobacterium dentium</i>	HQ697670	<i>B. dentium</i>	100	Genus <i>Bifidobacterium</i>	92,7	<i>B. dentium</i>	90	+ Stäb./kok.	-	20	31
50-242	67. <i>L. paracasei</i>	HQ697671	<i>L. paracasei</i>	100	<i>L. casei / L. paracasei / L. rennanaqilfy</i>	98,8	<i>L. casei</i>	99	+ Stäbchen	-	-	-
50-243	68. <i>L. parabuchneri</i>	HQ697672	<i>L. parabuchneri</i>	100	<i>L. parabuchneri</i>	99	<i>L. parabuchneri</i>	99	+ Stäbchen	-	-	-

Tab.3: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen

9 Lebenslauf

Hendrik Felke

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.