

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin des
Charité Centrum 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Kariesprotektive Eigenschaften verschiedener Probiotika *in vitro*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Stefan Wittner

aus Tübingen

Datum der Promotion: 18.09.2020

Vorwort

Hiermit weise ich, Moritz Stefan Wittner, darauf hin, dass Ergebnisse aus meiner Dissertation in folgender Vorabpublikation bereits veröffentlicht wurden.

Posterpräsentation der Studienergebnisse „Anti-cariogenic properties of different probiotic bacteria in-vitro.“ (Autoren: Göstemeyer G, Wittner M, Paris S, Schwendicke F.) auf der 9. „ConsEuro Conference“ in Berlin, Deutschland, 14. – 15. Juni 2019.

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt	9
2. Einleitung	11
3. Literaturübersicht	12
3.1. Karies	12
3.1.1. Ätiologie der Karies	12
3.1.2. Kariestherapie und Kariesprävention.....	14
3.2. Probiotika	16
3.2.1. Definition und Anwendung von Probiotika	16
3.2.2. Probiotika in der Kariestherapie	16
3.3. Kariesprotektive Eigenschaften von Probiotika	17
3.3.1. Arginin-Deiminase-System (ADS)	17
3.3.1.1. Physiologische Bedeutung und Regulation des ADS.....	18
3.3.1.2. Kariespräventiver Effekt durch das ADS.....	19
3.3.2. Zuckerfermentation von oralen Mikroorganismen.....	21
3.3.2.1. Zucker	21
3.3.2.2. Fermentation von Zucker im Rahmen des Stoffwechsels	22
3.3.2.3. Zusammenhang oraler Zuckerfermentation mit Karies	23
3.3.2.4. Zuckerfermentation von Probiotika	24
3.3.3. Adhäsion oraler Mikroorganismen an die Zahnhartsubstanz.....	25
3.3.3.1. Physiologie der bakteriellen Adhäsion	25
3.3.3.2. Bedeutung der Adhäsion an Zahnhartsubstanz für Probiotika	25
4. Fragestellung	27
5. Material und Methoden	28
5.1. Probiotische Stämme	28
5.1.1. Auswahl der probiotischen Stämme	28
5.1.2. Stammhaltung und Kultivierung der probiotischen Stämme	29
5.2. ADS-Aktivität	31
5.2.1. Kultivierung.....	32
5.2.2. Verdünnen der Übernachtskulturen.....	32
5.2.3. Inkubationszeit.....	32
5.2.4. Probenvorbereitung	33
5.2.5. Bestimmung der Protein- und Citrullin-Konzentration.....	33
5.2.6. Rechnerische Bestimmung der ADS-Aktivität	34
5.3. Zuckerfermentation	34
5.3.1. Kultivierung.....	35
5.3.2. Waschen und Einstellen der optischen Dichte	36

5.3.3. Herstellung modifizierter Nährmedien für Fermentationstest.....	36
5.3.4. Testdurchführung	37
5.3.5. Optische Bestimmung des pH-Wertes.....	37
5.4. Adhäsion an S-HA.....	38
5.4.1. Probenvorbereitung und Pellikelbildung	40
5.4.2. Kultivierung.....	40
5.4.3. Waschen und Einstellen der optischen Dichte	40
5.4.4. Versuchsdurchführung	41
5.4.5. Photometrische Bestimmung der Adhäsion.....	42
5.5. Statistische Auswertung	43
6. Ergebnisse	44
6.1. Auswertung der ADS-Aktivität.....	44
6.2. Auswertung des Zuckerfermentationstests	45
6.3. Auswertung der Adhäsion an S-HA.....	47
6.4. Ergebnisübersicht.....	48
7. Diskussion	50
7.1. Diskussion der Ergebnisse.....	50
7.1.1. ADS-Aktivität	50
7.1.2. Zuckerfermentation.....	51
7.1.3. Adhäsion an S-HA.....	54
7.1.4. Versuchsübergreifend	57
7.2. Diskussion der Methodik und Limitationen.....	60
7.2.1. Nährmedien.....	60
7.2.2. Messung der ADS-Aktivität.....	61
7.2.3. Zuckerfermentationstest	63
7.2.4. Messung der Adhäsion an S-HA	64
8. Schlussfolgerungen	67
9. Zusammenfassung.....	68
10. Literaturverzeichnis.....	69
11. Anhang.....	83
11.1. Eidesstattliche Versicherung.....	83
11.2. Publikationsliste.....	84
11.3. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen.....	85
11.3. Lebenslauf	86
11.4. Danksagung	87

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Venn-Diagramm nach Keyes	12
Abb. 2 Ökologische Verschiebung in der dentalen Plaque durch Zuckerkonsum.....	14
Abb. 3 Schematische Darstellung des ADS.....	18
Abb. 4 Kariespräventiver Effekt durch das ADS	20
Abb. 5 Anaerobe Glykolyse	23
Abb. 6 Kultivierung der Bakterienstämme für verschiedene Untersuchungen	30
Abb. 7 Flow-Chart: Bestimmung der ADS-Aktivität.....	31
Abb. 8 Photometrische L-Citrullin Bestimmung in einer 96-well Platte	34
Abb. 9 Flow-Chart: Fermentationstest	35
Abb. 10a-d Fermentationstest mit 3 Stämmen und jeweils 6 Proben	38
Abb. 11 Flow-Chart: Bestimmung der Adhäsion an S-HA	39
Abb. 12a Inkubierte S-HA Discs nach Anfärbung mit Kristallviolett und Trocknung	42
Abb. 12b Gefärbte Essigsäurelösungen vor Messung der optischen Dichte.....	42
Abb. 13 Barcharts für die ADS-Aktivität.....	45
Abb. 14 Barcharts für das Adhäsionsvermögen an S-HA.....	48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Kultivierung der Stämme im Brutschrank	30
Tab. 2 Zusammensetzung der modifizierten MRS-Bouillon.....	36
Tab. 3 Ergebnisse des Fermentationstests nach 24, 48 und 72 Stunden	46
Tab. 4 Heatmap zum Vergleich der Ergebnisse aller ermittelten Datenwerte	49

1. Abstrakt

Ziel: Probiotika könnten zur Vorbeugung und Therapie von Karies eingesetzt werden. Ziel war es, Eigenschaften, die für die Kariesprävention relevant sein könnten (Arginin-Deiminase-System (ADS)-Aktivität, Kariogenität, Adhäsion), bei unterschiedlichen probiotischen Bakterienstämmen zu evaluieren.

Methoden: Sechs probiotische Laktobazillen (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus paracasei* F-19, *Lactobacillus rhamnosus* GG und LB 21, *Lactobacillus reuteri* DSM 17928 und PTA 5289), zwei Streptokokken (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oligofermentans*) und ein Bifidobakterium-Stamm (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB-12) wurden ausgewählt. Die ADS-Aktivität wurde durch Messen der produzierten L-Citrullin-Menge nach Inkubation der Bakterienstämme mit Galaktose und Arginin bestimmt. Die Kariogenität wurde mittels eines Fermentationstests mit Saccharose in Mikrotiterplatten durch pH-Wert-Bestimmung bewertet. Die Adhäsionseigenschaften wurden bestimmt, indem die Menge adhärierter Bakterien an mit Speichel überzogenem Hydroxylapatit gemessen wurde. *Streptococcus mutans* ATCC 25175 wurde als positive Kontrolle für die Adhäsion und Fermentation verwendet. Unterschiede zwischen den Stämmen wurden mittels ANOVA und post-hoc Tukey's HSD-Test evaluiert.

Ergebnisse: Die evaluierten Parameter variierten stark zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen. *Lactobacillus reuteri* PTA 5289 hatte eine signifikant höhere ADS-Aktivität als alle anderen Gruppen, gefolgt von *Streptococcus oligofermentans* ($p < 0,05$ /HSD). Beide zeigten außerdem nach Inkubation mit Saccharose keinen pH-Abfall. Im Fermentationstest fiel der pH-Wert bei *Lactobacillus rhamnosus* LGG und *Lactobacillus paracasei* F-19 unter einen kritischen Wert von 5,2. *Streptococcus oligofermentans* zeigte die signifikant höchste Adhäsionskapazität aller getesteten Stämme. Die Adhäsion aller Laktobazillus- und Bifidobakterien-Stämme war signifikant niedriger im Vergleich zu den Streptokokkus-Stämmen ($p < 0,05$).

Schlussfolgerung: *Streptococcus oligofermentans* und *Lactobacillus reuteri* PTA 5289 weisen vielversprechende Eigenschaften für die Kariesprävention auf. In weiteren Studien sollte der Einfluss dieser Stämme auf kariogene Biofilme und die Demineralisation von Zahnhartsubstanz näher untersucht werden.

English version

Objectives: Probiotics can be used for prevention and treatment of caries. The aim was to evaluate characteristics which are relevant for the prevention of caries (arginine-deiminase-system (ADS)-activity, cariogenicity, adhesion) from different probiotic strains.

Methods: Six lactobacilli (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus paracasei* F-19, *Lactobacillus rhamnosus* GG und LB 21, *Lactobacillus reuteri* DSM 17928 und PTA 5289), two streptococci (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oligofermentans*) and one bifidobacterium strain (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB-12) were selected. The ADS-activity was assessed by measuring the production of L-Citrullin after incubation of the bacterial strains in the presence of galactose and arginine. Cariogenicity was evaluated using a fermentation assay with saccharose in microtiter plates with a pH value determination. The adherence characteristics were determined by measuring the amount of bacteria adhered to saliva coated hydroxyapatite. *Streptococcus mutans* strain ATCC 25175 was used as the positive control for bacterial adhesion and fermentation. Differences between the strains were evaluated using ANOVA and post-hoc Tukey's HSD test.

Results: The evaluated parameters varied widely between the different bacterial strains. *Lactobacillus reuteri* PTA 5289 had a significantly higher ADS-activity than all other groups, followed by *Streptococcus oligofermentans* ($p < 0,05$ /HSD). Furthermore, both showed no pH drop after incubation with saccharose. In the fermentation assays with *Lactobacillus rhamnosus* LGG and *Lactobacillus paracasei* F-19 pH dropped under a critical value of 5.2. *Streptococcus oligofermentans* showed the significantly highest adhesion capacity of all the tested strains. The adhesion of all lactobacilli and the bifidobacterium strains was lower in comparison to the streptococci strains ($p < 0,05$)

Conclusion: *Streptococcus oligofermentans* and *Lactobacillus reuteri* PTA 5289 have promising characteristics for the prevention of caries. Further studies should aim to investigate the influence of these strains on cariogenic biofilms and the demineralization of dental hard tissue.

2. Einleitung

Aufgrund von Fortschritten in der Prophylaxe und Therapie von Karies geht die Prävalenz dieser Erkrankung seit Jahren in Deutschland zurück (Micheelis et al., 2006; Jordan und Micheelis, 2016). Ein Rückgang der Karieserfahrung ist aber nicht für alle Bevölkerungsgruppen gleichermaßen zu beobachten. Eine Gruppe, bei der das breite Spektrum an Vorsorge und Therapie versagt, sind Personen, v.a. Kinder und Jugendliche, aus niedrigen sozialen Schichten (Truin et al., 1998). Im Vergleich zu Personen höherer sozialer Schichten vernachlässigen Personen mit niedrigem sozioökonomischem Status häufiger die Mundhygiene und nehmen zahnärztliche Vorsorgeuntersuchungen seltener in Anspruch. Das Resultat ist eine ausgeprägte Polarisierung der Karieserfahrung (Pitts et al., 2007). Ein weiterhin hohes Kariesrisiko weisen auch motorisch eingeschränkte Personen auf, welche häufig keine selbständige, adäquate Mundhygiene betreiben können. Ein Beispiel sind demnach pflegebedürftige Senioren, bei denen aktuelle Konzepte zur Kariesprävention nur schwer anwendbar sind. Daher besteht ein hoher Bedarf zur Entwicklung von Kariespräventionsmaßnahmen, bei denen ein besonderer Fokus auf einer einfachen Anwendung liegt.

Ein neuartiges Behandlungskonzept zur Prophylaxe und Arretierung von Karies, dessen Einsatz für beide beschriebenen Risikogruppen denkbar ist, sind Probiotika, die Lebensmitteln zugesetzt werden. Probiotika wurden bereits erfolgreich zur Behandlung gastrointestinaler Erkrankungen eingesetzt (Oberhelman et al., 1999; Szajewska und Mrukowicz, 2001). Auch der Einsatz von Probiotika zur Prävention und Behandlung von biofilmassoziierten oralen Erkrankungen erscheint vielversprechend. Dabei wird primär das Ziel verfolgt, durch die Applikation probiotischer Bakterienstämme den dentalen Biofilm dahingehend zu modifizieren, dass potenziell pathogene Keime verdrängt werden.

Es werden bereits unterschiedliche Probiotika zur Prävention oraler Erkrankungen vermarktet. Dennoch sind mögliche kariespräventive Effekte von Probiotika noch nicht ausreichend untersucht worden. Die in dieser Arbeit beschriebene In-vitro-Studie vergleicht neun verschiedene Probiotika hinsichtlich drei verschiedener Parameter (Arginin-Deiminase-System (ADS)-Aktivität, Säureproduktion nach Zugabe von Saccharose und Adhäsion an Hydroxylapatit), die bei der Kariesprävention eine Rolle spielen. Mithilfe der Ergebnisse dieser Studie können vielversprechende probiotische Stämme für die Kariesprävention und -behandlung identifiziert werden.

3. Literaturübersicht

3.1. Karies

Karies ist die weltweit am häufigsten verbreitete, nicht-übertragbare Erkrankung (Petersen, 2003; Marcenes et al., 2013; Jin et al., 2016). Der Krankheitsverlauf ist durch eine lokale Zerstörung der Zahnhartsubstanzen infolge von voranschreitendem Mineralverlust gekennzeichnet. In Deutschland ist Karies trotz einer signifikant zurückgehenden Prävalenz (Micheelis et al., 2006; Jordan und Micheelis, 2016) gemeinsam mit der Parodontitis nach wie vor der Hauptgrund für Zahnverlust (Glockmann et al., 2011).

3.1.1. Ätiologie der Karies

Die „Chemoparasitäre Theorie“ von Miller aus dem Jahr 1898 hat sich unter zahlreichen Theorien durchgesetzt und bildet die Grundlage später entwickelter Erweiterungen von Theorien zur Kariesentstehung. Im Mittelpunkt der Theorie stehen kariogene Mikroorganismen, die im Rahmen ihrer Metabolisierung von Kohlenhydraten aus Nahrungspartikeln organische Säuren produzieren, welche zum Mineralverlust von Zahnhartsubstanz führen (Miller, 1889). Durch Keyes wurde in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts das erste Modell zur Ätiologie der Karies entwickelt. Er beschrieb die notwendige Anwesenheit von „Zahn“, „Substrat“ (Zucker) und „Bakterien“ und die Wechselbeziehungen zwischen diesen Faktoren. Das Keyes Modell wird häufig in einem Venn-Diagramm zusammengefasst (Abb. 1) (Keyes, 1960; Keyes, 1968).



Abb. 1 Venn-Diagramm nach Keyes

Ausgangspunkt des kariogenen Geschehens ist die dentale Plaque: eine Ansammlung von oralen Mikroorganismen, die in einem Biofilm organisiert die betroffenen Zahnoberflächen bedecken. Ein Biofilm ist eine dreidimensionale Ansammlung interagierender Mikroorganismen, die in eine Matrix extrazellulärer, polymerer Substanzen eingebettet sind (Marsh, 2004).

Die am besten untersuchten kariogenen Mikroorganismen der dentalen Plaque sind *Streptococcus mutans* (SM), *Streptococcus sobrinus* und Laktobazillen. Ihre Beteiligung am Kariesprozess hat sich in zahlreichen Studien bestätigt (Tanzer et al., 2001). Diese Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie selbst bei niedrigen pH-Werten in der Lage sind, fermentierbare Kohlenhydrate zu Säuren zu verstoffwechseln. Das Resultat ist ein Absinken des pH-Wertes in der lokalen Plaque (Ten Cate et al., 2003). Ein Unterschreiten des kritischen pH-Wertes führt zu einer Demineralisation der Zahnhartsubstanzen. Beim Wiederanstieg des pH-Wertes kommt es beim Überschreiten dieses Grenzwertes wieder zu einer Einlagerung von Mineralien, die vorwiegend im Speichel gelöst sind. Diesen Prozess nennt man Remineralisation. Überwiegen über die Zeit Demineralisationsprozesse gegenüber der Remineralisation, kann dies zu einem dauerhaften Verlust von Zahnhartsubstanz führen – eine Kariesläsion ist entstanden.

Im heutigen wissenschaftlichen Konsens ist die einfache Erklärung von Keyes nicht mehr ausreichend, um die Komplexität der Erkrankung Karies zu beschreiben. Es gibt zahlreiche Belege dafür, dass die Erkrankung auf einem multifaktoriellen Geschehen basiert (Harris et al., 2004; Fejerskov und Kidd, 2008). Sekundäre Faktoren wie Speichelzusammensetzung, Immunabwehr und sozioökonomische Faktoren (Menaker, 1980) müssen ebenfalls betrachtet werden, um das individuelle Kariesrisiko eines Menschen bewerten zu können. Die Kritik an der Miller'schen Plaquehypothese und der daraus abgeleiteten „Spezifischen Plaquehypothese“ (Tanzer, 1995), welche die Infektion mit einem einzelnen Erreger in den Mittelpunkt stellt, häufte sich. Die Forderungen nach einem Paradigmenwechsel (Fejerskov, 2004; Marsh, 2006) führten zu einer Veränderung der Beschreibung von Karies als einem multifaktoriellen Geschehen, bei dem eine Störung der Homöostase der Mikroflora im Biofilm im Vordergrund steht (ökologische Plaquehypothese) (Marsh, 1994): Kariogene Erreger, allen voran SM, sind nicht per se Auslöser einer "Kariesinfektion", sondern gehören zur physiologischen Flora der Mundhöhle. Erst eine unverhältnismäßig starke Vermehrung dieser Erreger kann letztendlich zur Kariesentstehung führen (Fejerskov, 2004). Im Mittelpunkt der ökologischen Plaquehypothese steht eine Veränderung der Zusammensetzung der

Plaque. Der übermäßige Konsum fermentierbarer Kohlenhydrate resultiert in persistierenden Intervallen niedriger pH-Werte in der Plaque. Dies hat veränderte Umweltbedingungen zur Folge zugunsten von azidurischen (säuretoleranten) und azidogenen (säurebildenden) Mikroorganismen (Abb. 2), welche kompetitiv die physiologische Plaqueflora verdrängen (Marsh, 1994).

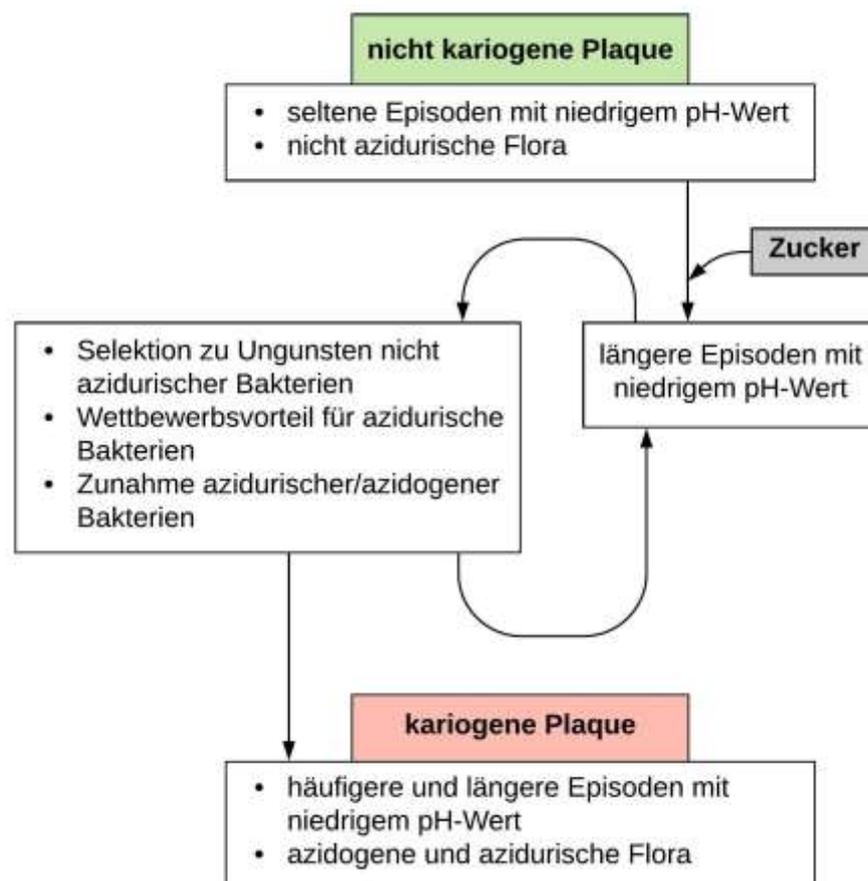


Abb. 2 Ökologische Verschiebung in der dentalen Plaque durch Zuckerkonsum

Modifiziert nach Shellis (2012)

3.1.2. Kariestherapie und Kariesprävention

Im Zuge des Wandels der Theorien zur Kariesentstehung haben sich auch die Methoden der Kariesbehandlung verändert. Eine invasive Therapie (z.B. das Legen einer Füllung) soll demnach durch die Anwendung nicht- oder mikro-invasiver Maßnahmen in früheren Kariesstadien verhindert beziehungsweise verzögert werden.

Paris et al. teilen die Therapieoptionen für kariöse Läsionen in invasive, mikro-invasive und nicht-invasive Maßnahmen auf. Hauptkriterien bei der Auswahl des optimalen Therapiemittels sind die Läsionsausdehnung (ICDAS-Stadium) und die Aktivität der

kariösen Läsion (Paris et al., 2012). Unter der invasiven Therapie versteht man dabei die Entfernung kariöser Zahnhartsubstanz und den darauf folgenden Ersatz des Defektes durch dentale Restaurationsmaterialien. Die mikro-invasive Therapie zielt darauf ab, Diffusionsbarrieren für bakterielle Säuren und für die Substratzufuhr für kariogene Mikroorganismen zu errichten und somit ein Fortschreiten nicht-kavitierter bzw. mikro-kavitierter Läsionen zu verhindern. Dazu zählen die Versiegelung von Fissuren (Mertz-Fairhurst et al., 1998) und die Infiltration approximaler Kariesläsionen (Meyer-Lückel und Paris, 2011) mittels niedrigvisköser Kunststoffe. Grundlage der non-invasiven Therapien sind Maßnahmen, bei denen die Zahnhartsubstanz nicht irreversibel verändert wird. Ziel ist es, durch ein frühzeitiges Eingreifen in den Kariesprozess das Fortschreiten der Erkrankung bereits in initialen Stadien zu verhindern. Hierzu gehören die Beeinflussung der Ernährung, v.a. die Reduktion des Zuckerkonsums, die Beeinflussung der Mineralisation durch eine Therapie mit mineralisationsfördernden Substanzen wie Fluoriden und die Beeinflussung des Biofilms. Die mechanische und chemische Beeinflussung des Biofilms zielt vorwiegend auf eine Reduktion der Gesamtmasse des Biofilms durch Mundhygienemaßnahmen bzw. antibakterielle Substanzen wie Chlorhexidin (CHX) ab.

Eine weitere Möglichkeit, den Biofilm zu beeinflussen, besteht in der biologischen Modulation des Biofilms mittels probiotischer Mikroorganismen. Im Unterschied zur chemischen und mechanischen Biofilmentfernung kommt es bei diesem Ansatz zu einer Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung innerhalb der dentalen Plaque und daraus resultierend zu einer positiven Beeinflussung des ökologischen Gleichgewichtes zugunsten nicht-kariogener Mikroorganismen (Gordan et al., 2011). Die genannten Maßnahmen können gleichermaßen zur Kariesprävention und zur Kariestherapie eingesetzt werden. Mundhygienemaßnahmen, lokale Fluoridierung und die Steuerung der Ernährung werden gemeinsam mit der präventiven Fissurenversiegelung als die klassischen Säulen der Kariesprävention bezeichnet. Die Anwendung von Probiotika zur Kariesprävention wäre eine denkbare Erweiterung im Portfolio der Möglichkeiten zur Beeinflussung des Biofilms. Bei Patienten mit hohem Kariesrisiko, z.B. bei Kindern oder älteren Patienten, könnten Probiotika ergänzend zu klassischen Präventionsstrategien eingesetzt werden (Cagetti et al., 2013; Campus et al., 2014; Gruner et al., 2016).

3.2. Probiotika

3.2.1. Definition und Anwendung von Probiotika

Die heute gültige und von der WHO anerkannte Definition für Probiotika stammt aus dem Jahr 1998 und definiert sie als „lebende Mikroorganismen, die, wenn in ausreichender Menge verabreicht, dem Wirtsorganismus einen gesundheitlichen Nutzen verschaffen“ (Guarner und Schaafsma, 1998). Ihren Ursprung in der medizinischen Therapie haben Probiotika in der Behandlung gastrointestinaler Erkrankungen. Grundlegendes Prinzip dabei ist die positive Modulation der residenten Darmflora durch apathogene Keime. Für verschiedene Krankheitsbilder im Rahmen gastrointestinaler Leiden konnten therapeutische bzw. prophylaktische Effekte von Probiotika nachgewiesen werden. Positive Effekte konnten z.B. für die Behandlung von akuten Diarrhöen nachgewiesen werden (Oberhelman et al., 1999; Szajewska und Mrukowicz, 2001). Auch bei der Rezidivprophylaxe chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa (Rembacken et al., 1999; Kruis et al., 2004) oder einer Pouchitis (Gionchetti et al., 2000; Mimura et al., 2004) war die probiotische Therapie erfolgreich.

Die am häufigsten verwendeten Bakterienstämme sind Laktobazillen, Bifidobakterien, *E. coli* nissle 1917 und Streptokokken. Probiotika werden entweder Nahrungsmitteln zugesetzt, meist in Form von Milchsäureprodukten, wie z.B. Joghurt oder Milch, oder als Medikamente appliziert (Reinkulturen oder definierte Gemische verschiedener Bakterienstämme) (Bischoff und Manns, 2005).

3.2.2. Probiotika in der Kariestherapie

Es gibt Bestrebungen, die positiven Effekte der Behandlung gastrointestinaler Erkrankungen mit Probiotika auch auf orale Erkrankungen zu übertragen. Bei der probiotischen Therapie zur Behandlung und Prävention von Karies sollen nichtpathogene Bakterien regelmäßig verabreicht werden und dadurch in den dentalen Biofilm integriert werden. Hier sollen sie mit kariogenen Bakterien wie *SM* um die gleiche ökologische Nische konkurrieren. Hauptmerkmale eines probiotischen Stammes in der „Replacement-Therapie“ sind „das Fehlen von Pathogenitätsfaktoren, eine Kolonisationsfähigkeit und die Fähigkeit, das feindliche Bakterium konkurrierend zu ersetzen“ (Burton et al., 2011). Durch die Integration neuer Mikroorganismen in den Biofilm konnten neben dem Besetzen der ökologischen Nische von *SM* weitere mögliche kariesprotektive Effekte initiiert werden. Dazu zählen die Verhinderung des Wachstums von *SM* durch die

Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Tong et al., 2007; Bao et al., 2015; Huang et al., 2016), eine Reduktion der Glukan-Produktion von *SM* (Lee und Kim, 2014) oder ein Aufrechterhalten des pH-Wertes in der dentalen Plaque durch die Produktion von Ammoniak mittels des Arginin-Deiminase-Systems (Huang et al., 2016).

Effektiver als ein Verdrängen von *SM* im dentalen Biofilm könnte auch eine starke Reduzierung der Adhäsion von *SM* durch eine Bindung der konsumierten Probiotika an spezifische Speichelproteine (Glykoprotein-340 (gp340)) sein. Ein Glykoprotein ist ein Makromolekül, das aus einem Protein und einem oder mehreren kovalent gebundenen Kohlenhydratgruppen besteht. Durch die Bindung an gp340, welche die Hauptbindungsstellen für *SM* darstellen, werden die Glykoproteine aus dem Speichel des Pellikels (siehe S. 25) "pseudo-entfernt", was mit einer niedrigeren Bindung von *SM* korreliert (Haukioja et al. 2008). In Studien über probiotische Arten verschiedener Laktobazillen- oder Bifidobacterium-Stämme konnten entweder die antibakteriellen Wirkungen gegen *SM* (Çaglar et al., 2007; Çaglar et al., 2008b; Ashwin et al., 2015) oder die Reduzierung der bakteriellen Aktivität in kariösen Läsionen (Nase et al., 2001; Petersson et al., 2011) gezeigt werden. Insgesamt ist die Evidenz zum Einsatz von Probiotika zur Kariestherapie oder -prävention bisher trotzdem lückenhaft. In vielen Studien wurde nur die Auswirkung auf die Menge an *SM*, nicht aber auf aussagekräftigere Parameter wie Karieszuwachs untersucht (Gruner et al., 2016). Zudem wurden kommerziell genutzten Probiotika wie *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) ein kariogenes Potential zugeschrieben (Schwendicke et al., 2014). Klinische Studien zeigten zudem teils keinerlei Reduktion der Aktivität kariöser Läsionen in Anwesenheit von Probiotika (Haslöf et al., 2013; Stecksén-Blicks et al., 2009).

3.3. Kariesprotektive Eigenschaften von Probiotika

3.3.1. Arginin-Deiminase-System (ADS)

Das Arginin-Deiminase-System ist bei prokaryotischen Lebewesen der meist verbreitete anaerobe Stoffwechselweg für den Abbau von Arginin (Zúñiga et al., 2002). Es ist in einer Vielzahl von Bakterien vorhanden, darunter auch viele, welche die Zahnhartsubstanz und die Weichgewebe der Mundhöhle kolonisieren. Dazu gehören unter anderem *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* (SS), *Streptococcus parasanguinis*, und einige Bakterienstämme der Spezies *Lactobacillus* (Marquis et al., 1987; Rogers, 1990; Burne und Marquis, 2000).

Das Arginin-Deiminase-System (ADS) ist ein kataboler, anaerober Stoffwechselfvorgang, der die Umsetzung von Arginin zu Ornithin katalysiert (Abb. 3). Teil dieses Systems sind die drei Enzyme Arginin-Deiminase (AD), Ornithin-Carbamoyltransferase (OTC) und Carbamat-Kinase (CK). Am Anfang steht die Hydrolyse von Arginin durch das Enzym AD. Dabei entstehen Citrullin und Ammoniak (NH_3). Danach wird durch OTC Citrullin mittels anorganischem Phosphat (P_i) zu Ornithin und Carbamoylphosphat umgewandelt. Das dritte Enzym im Stoffwechselweg, CK, überträgt die Phosphatgruppe vom Carbamoylphosphat auf Adenosindiphosphat (ADP). Dabei entstehen Adenosintriphosphat (ATP), Ammoniak und Kohlendioxid (CO_2). Zusammengefasst werden im gesamten Stoffwechselweg pro Mol Arginin ein Mol Ornithin, zwei Mol Ammoniak, ein Mol Kohlendioxid und ein Mol ATP generiert (Burne und Marquis, 2000). Der körpereigene Argininbedarf speist sich aus endogenen und exogenen Quellen. Die körpereigene Neubildung findet im Rahmen des Harnstoffzyklus statt. Die exogene Aufnahme erfolgt durch den Konsum von Lebensmitteln. Arginin ist ein Bestandteil von Nahrungsproteinen und wird üblicherweise in Mengen von 4-6 g/Tag aufgenommen (Ströhle und Hahn, 2012). Weitere exogene Quellen sind die Verabreichung von industriell gewonnenem Arginin in Nahrungsergänzungsmitteln oder als Bestandteil von Zahnpasten.

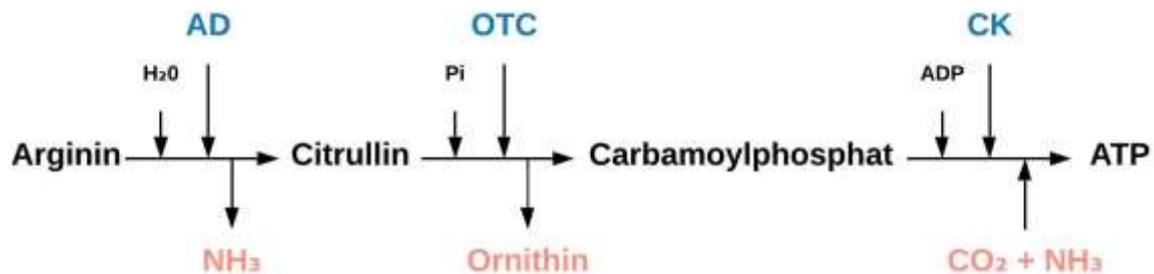


Abb. 3 Schematische Darstellung des ADS

Modifiziert nach Gamper et al. (1991).

3.3.1.1. Physiologische Bedeutung und Regulation des ADS

Das ADS-System hat eine Schlüsselfunktion im physiologischen Stoffwechsel der Bakterien. Es schützt vor den negativen Effekten eines niedrigen pH-Wertes und dient zugleich zur Gewinnung von ATP, einem universellen Energieträger in lebenden Organismen. Bakterien, die nur bedingt azidurisch sind, neutralisieren durch die

Produktion von Ammoniak den lokalen pH-Wert (Marquis et al., 1987; Casiano-Colon und Marquis, 1988; Curran et al., 1995; Liu et al., 2008) und schützen sich so vor einer Ansäuerung des umgebenden Gewebes im Falle einer Säureproduktion azidogener Bakterien in der Plaque. ADS-fähige Bakterien sind in der Lage, Ammoniak zu bilden und das auch bei einem pH-Wert, bei dem Wachstum oder Glykolyse nicht mehr möglich wären. Bei einigen Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus plantarum* kann die Arginolyse sogar zu einem verstärkten Wachstum führen (Moustafa und Collins, 1968; Crow und Thomas, 1982). Die Regulierung der ADS-Aktivität korreliert mit den vorherrschenden Bedingungen im ökologischen Habitat der Bakterien. Hauptfaktor für die Induktion des ADS ist Energiemangel (Cunin et al., 1986). Bei *Pseudomonas aeruginosa* dient die Induktion des ADS als alternativer ATP-generierender Stoffwechselweg und wird durch die Anwesenheit von Arginin unter anaeroben Bedingungen aktiviert (Gamper et al., 1991). Eine Vielzahl von Studien konnte zeigen, dass äußere Einflüsse maßgeblich verantwortlich sind für die Regulierung des ADS oraler Streptokokken. Durch die Anwesenheit von Kohlenhydraten wie Glukose oder Saccharose und bei aeroben Bedingungen kann unter Umständen die Arginolyse-Aktivität von SS und *Streptococcus gordonii* eingeschränkt werden (Curran et al., 1995). Die Anwesenheit von Saccharose, eine geringe Pufferkapazität im Biofilm und pH-Werte unter 4,5 behindern die Alkali-Produktion aus Arginin in oralen Biofilmen (Huang et al., 2012). Bei einem pH-Wert von 5,5 erreicht die Alkali-Produktion ihr Maximum (Liu et al., 2008; Liu und Burne, 2009; Huang et al., 2012). Bei dem Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* führt eine Erniedrigung des pH-Wertes von 7,0 auf 5,0 zu einer Induktion des ADS (Budin-Verneuil et al., 2006). Bei anderen Bakterien wie *Lactobacillus plantarum* führt die Induktion durch Arginin und extrem niedrige pH-Werte zur Expression des ADS (Arena et al., 1999; Spano et al., 2004).

3.3.1.2. Kariespräventiver Effekt durch das ADS

Die Zahnhartsubstanz wird demineralisiert, wenn durch einen kariogenen Säureangriff der pH-Wert innerhalb der Plaque unter den kritischen pH-Wert fällt. Erstmals 1982 wurde beschrieben, dass die Produktion von Ammoniak aus Speichelbestandteilen eine entscheidende Rolle spielen könnte, den Plaque-pH-Wert aufrecht zu erhalten und die Kariesentstehung zu verhindern (Abb. 4) (Kleinberg et al., 1982). Die zwei Hauptquellen für Ammoniak aus Speichelbestandteilen sind Arginin über das ADS-System und Harnstoff über die Hydrolysierung durch das Enzym Urease (Nascimento et al., 2009;

Morou-Bermudez et al., 2011). Arginin kommt im Speichel sowohl in seiner freien Form vor als auch gebunden an Peptide und Proteine, aus welchen es durch Proteasen und Peptidasen freigesetzt werden kann. Die Konzentration von freiem Arginin im Speichel beträgt ca. 50 µmol/l (Van Wuyckhuysse et al., 1995; Burne und Marquis, 2000).

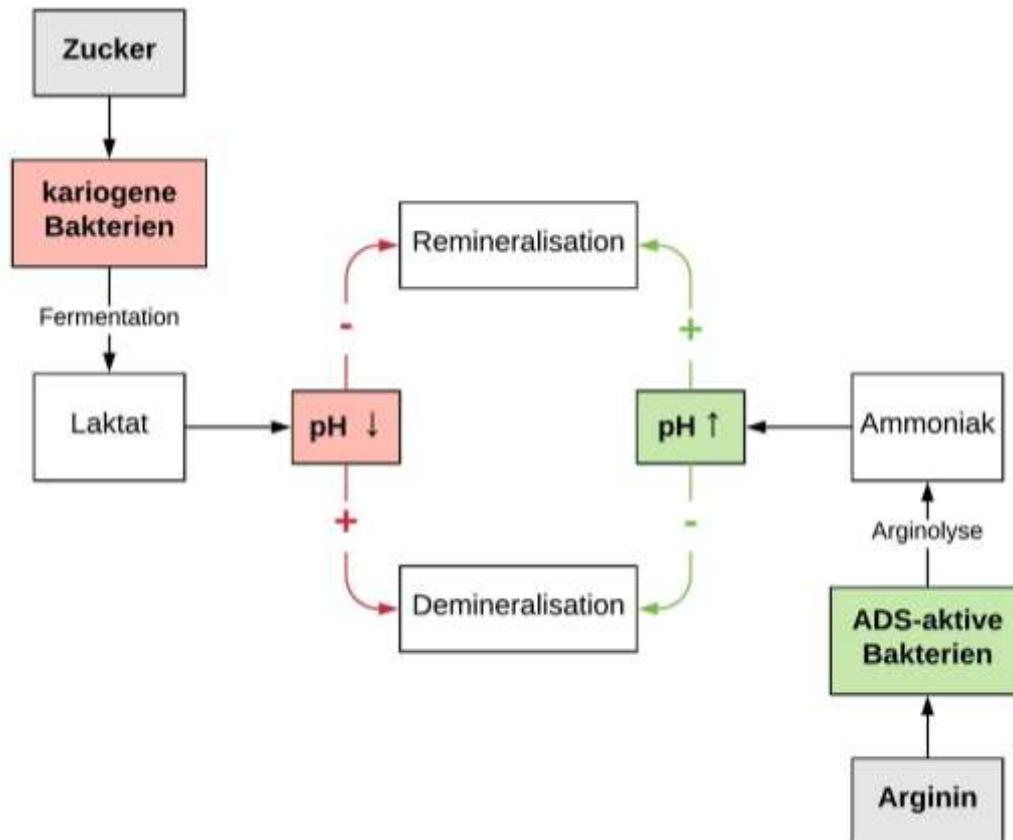


Abb. 4 Kariespräventiver Effekt durch das ADS

Bei der Verstoffwechslung von Arginin (Arginolyse) durch das ADS entsteht das Nebenprodukt Ammoniak. Dadurch kann der lokale Plaque-pH-Wert aufrechterhalten, die Remineralisation gefördert und die Demineralisation gehemmt werden.

Klinische Studien haben gezeigt, dass kariesfreie Patienten im Vergleich zu kariesaktiven Patienten einen signifikant höheren Gehalt an freiem Arginin im Speichel (Van Wuyckhuysse et al., 1995), eine höhere Ammoniak-Konzentration und höhere pH-Werte in der Plaque (Margolis et al., 1988) und eine höhere ADS-Aktivität sowohl in der Plaque als auch im Speichel aufweisen (Nascimento et al., 2009).

Es wurde nachgewiesen, dass der Kariesstatus von Kindern signifikant mit der ADS-Aktivität in der Plaque assoziiert ist. Gesunde Plaque zeichnete sich durch eine hohe ADS-Aktivität aus, während sich bei kariogener Plaque eine niedrigere ADS-Aktivität darstellte (Nascimento et al., 2013). Es gibt Hinweise, dass sich das Kariesrisiko erhöhen

könnte, wenn durch eine dauerhafte ökologische Veränderung in der dentalen Plaque die Anzahl Alkali-produzierender Bakterien reduziert wird (Gordan et al., 2011). Auf der Grundlage dieser Feststellungen basiert die Idee der probiotischen Therapie mit ADS-aktiven Bakterienstämmen. Bei Patienten mit hohem Kariesrisiko könnte durch die Einnahme von Mikroorganismen mit hoher ADS-Aktivität die orale Mikroflora verändert werden. Das Verhältnis zwischen Säure-produzierenden und Alkali-produzierenden Bakterien könnte sich zugunsten der Alkali-produzierenden Bakterienstämme verändern. Durch eine vermehrte Produktion von Ammoniak soll das Überschreiten kritischer pH-Werte verhindert werden. Unterstützt werden kann dieser Therapieansatz durch die zusätzliche Einnahme von Arginin. In einer klinischen Studie zeigte die Versuchsgruppe, die eine Zahnpasta benutzte, die 1,5 % Arginin und Fluorid enthielt, erhöhte pH- und Ammoniak-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche herkömmliche Fluorid-Zahnpasta verwendet hatte (Ten Cate und Cummins, 2013). Eine weitere mögliche kariesprotektive Wirkung durch die Einnahme von Arginin wurde in einer Studie aus dem Jahr 2017 beschrieben, die den Einfluss von Arginin auf die Biofilmbildung untersuchte. Es hat sich dabei herausgestellt, dass es durch die Anwesenheit von Arginin bei Multispezies-Biofilmen zu einer Reduktion von *SM* kommen kann. Erklären lässt sich dies wahrscheinlich dadurch, dass unter dem Einfluss von Arginin die Menge extrazellulärer Polysaccharide gesunken ist (Huang et al., 2017).

3.3.2. Zuckerfermentation von oralen Mikroorganismen

3.3.2.1. Zucker

Prinzipiell muss zwischen drei Zuckerarten unterschieden werden: Herkömmliche Zucker, Zuckerersatzstoffe (Süßstoffe) und Zuckeraustauschstoffe (Zuckeralkohole). Davon sind aber nur die herkömmlichen Zucker an der Kariesentstehung beteiligt. Zuckeraustauschstoffe (v.a. Xylit) haben teilweise sogar karieshemmende Eigenschaften (Makinen et al., 1995; Amaechi et al., 2012). Im allgemeinen Sprachgebrauch sind mit Zucker niedermolekulare Mono- und Oligosaccharide gemeint. Glukose und Fruktose gehören zu den wichtigsten Vertretern der Monosaccharide; Saccharose, Lactose und Maltose zu denen der Disaccharide. Bei der Spaltung von Saccharose entstehen die Monozucker Fruktose und Glukose. In puncto Kariogenität unterscheiden sich Saccharose, Glukose und Fruktose nicht wesentlich (Guggenheim et al., 1966; Colman et al., 1977).

3.3.2.2. Fermentation von Zucker im Rahmen des Stoffwechsels

Die meisten oralen Mikroorganismen regulieren ihren Energiebedarf durch den Abbau niedermolekularer Kohlenhydrate mittels der Glykolyse (Newbrun, 1967). Das im Rahmen der Glykolyse entstehende ATP ist wichtig für grundlegende Zellerhaltungsmaßnahmen. Unter Glykolyse versteht man den schrittweisen Abbau von Monosacchariden. Kurz zusammengefasst entstehen zwei Moleküle Pyruvat aus einem Molekül Glukose. Pyruvat ist ein Zwischenprodukt, welches in verschiedenen Endprodukten resultieren kann. Neben der Glykolyse nutzen viele kariogene Mikroorganismen der dentalen Plaque weitere intra- und extrazelluläre Stoffwechselwege zur Metabolisierung von Zuckern. Einige orale Mikroorganismen, z.B. *SM* wandeln mittels verschiedener Enzyme bis zu 10 % (Minah und Loesche, 1977; Hamada und Slade, 1980) der Saccharose um, bevor die Aufnahme in die Zelle stattfindet (Loesche, 1986). Über die Enzyme Glycosyltransferase und das Enzym Fructosyltransferase, welche sich auf der Zelloberfläche befinden, erfolgt die Umwandlung in Glukane und Fruktane (Wood und Critchley, 1966; Hamada und Slade, 1980). Glukane dienen der Vernetzung der Mikroorganismen (Schilling und Bowen, 1992) und der Adhäsion an Zahnoberflächen (Rölla, 1989). Fruktane sind Reserven für nährstoffarme Perioden (Wood, 1969). Nach der intrazellulären Aufnahme des Zuckers stehen der Zelle verschiedene Stoffwechselwege zur Verfügung.

Viele orale Mikroorganismen verstoffwechseln Saccharose oder andere Zucker über die anaerobe Glykolyse zu Pyruvat. Das anfallende Pyruvat wird bei hohen Zuckerkonzentrationen über das Enzym Lactatdehydrogenase zu Milchsäure umgewandelt (Abb. 5) (Cole und Eastoe, 1977). Kariogene Bakterien wie *SM* gehören zur Klasse der Milchsäurebakterien. Milchsäurebakterien sind homofermentativ, d.h. 90 % der Monosaccharide werden in Milchsäure umgewandelt (Kandler, 1983). Viele der kariogenen Bakterien sind außerdem in der Lage intrazelluläre Polysaccharide (IPS) vom Glykogen-Amylopektin-Typ zu bilden (Gibbons und Kapsimalis, 1963; van Houte et al., 1969). Dem intrazellulär gebildeten Glykogen wird dabei dieselbe Rolle einer Nährstoffreserve zuteil wie den extrazellulär gebildeten Fruktanen.

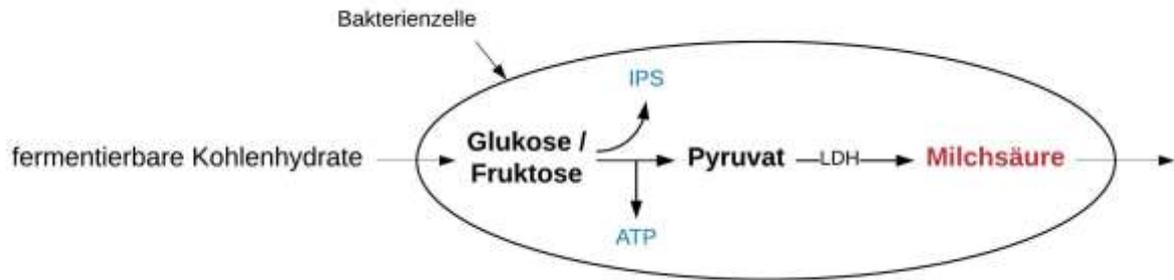


Abb. 5 Anaerobe Glykolyse

Modifiziert nach Ekstrand & Zero (2012).

3.3.2.3. Zusammenhang oraler Zuckerfermentation mit Karies

Sowohl aus tierexperimentellen Studien (Keyes, 1960) als auch aus kontrollierten klinischen Studien (Gustafsson et al., 1953; Fisher, 1968) ist seit Langem bekannt, dass der häufige Konsum fermentierbarer Kohlenhydrate mit dem Auftreten von Karies zusammenhängt. Die regelmäßige Einnahme führt außerdem zu einer Zunahme von SM und Laktobazillen in der dentalen Plaque (Dennis et al., 1975a; Staat et al., 1975; De Stoppelaar et al., 1969). Diese Beobachtung bekräftigt die „Ökologische Plaque Hypothese“ (Marsh, 1991), nach der ja niedrige pH-Werte für die ökologische Verschiebung in der residenten Mikroflora der Plaque verantwortlich sind. Es ist sehr gut untersucht, dass nach der Einnahme von fermentierbaren Kohlenhydraten (Glukose, Saccharose oder Fruktose) der neutrale pH-Wert innerhalb der Plaque schnell auf pH 5 oder niedriger fällt (Stephan, 1944; Bowen et al., 1966). Der pH-Wert-Abfall ist das Resultat der schnellen Verstoffwechslung von Zuckern über den Glykolysepfad und anschließend der Laktatdehydrogenase zu Laktat (siehe oben).

Es lassen sich zwei Phasen des kariogenen Säureangriffs unterscheiden. Eine initiale Phase mit schnellem Abfall des pH-Wertes und eine nach Verbrauch des konsumierten Zuckers folgende, bedeutend längere Phase der Wiederherstellung des pH-Wertes (Stephan, 1944). Der kritische pH-Wert ist erreicht, wenn der pH-Wert in der Plaque soweit abgesunken ist, dass es zu einem Mineralverlust an der Zahnoberfläche kommt. Für Schmelz liegt dieser Bereich bei einem pH-Wert von 5,5 (Shellis, 1996), für Dentin bei einem pH-Wert von 6,0 - 6,7 (Hoppenbrouwers et al., 1986; 1987; Sung et al., 2016). Neben dem direkten Effekt des kariogenen Säureangriffs gibt es durch andere Stoffwechselprodukte, die im Rahmen des Zuckermetabolismus entstehen, weitere Pathomechanismen, welche die Kariesentstehung begünstigen. Extrazellulär gebildete

Glukane dienen der Vernetzung der Bakterien zu einem stabilen Biofilm (Schilling und Bowen, 1992) und erlauben Zuckermolekülen durch eine Erhöhung der Porosität im Biofilm in die tiefsten Schichten des Biofilms vorzudringen (Dibdin und Shellis, 1988). Dies fördert die Entwicklung einer Kariesläsion (Cury et al., 2000; Mattos-Graner et al., 2000). Durch die Bildung von IPS und Fruktanen ist es den Bakterien auch in Phasen ohne Zuckerkonsum weiterhin möglich Energie zu produzieren. Folge ist eine verlängerte Säureexposition auf der Zahnoberfläche und ein Aufrechterhalten niedriger pH-Werte in der Plaque, auch lange nach der Nahrungsaufnahme (Tanzer et al., 1976). Die Bildung von IPS ist direkt mit Karies assoziiert (Gibbons und Socransky, 1962; Loesche und Henry, 1967; Tanzer et al., 1976).

3.3.2.4. Zuckerfermentation von Probiotika

Für gewöhnlich gehören die aktuell als vielversprechende Kandidaten angesehenen Probiotika der Klasse der Milchsäurebakterien an. Eine der Anforderungen an ein Probiotikum in der „Replacement-Therapie“ ist das Fehlen von Pathogenitätsfaktoren (Burton et al., 2011). Übertragen auf die Pathogenese der Karies bedeutet dies, dass probiotische Bakterien selbst nicht in der Lage sein sollten durch Fermentation von Zuckern eine Menge an Laktat zu produzieren, die zu einem kritischen pH-Wert führt. Hedberg et al. untersuchten die Säureproduktion verschiedener Probiotika nach Zugabe von Zuckern und stellten fest, dass für einige Probiotika schon 24 Stunden (*L. plantarum* 299v und *L. plantarum* 931), für andere 48 Stunden (*LGG*) nach der Zugabe von Saccharose der pH-Wert unter den Wert von 5,2 fällt (Hedberg et al., 2008). Die bakterielle Fermentation kann aber neben schädlichen Effekten auch gesundheitsfördernd sein. Lee et al. zeigten in einer In-vitro-Studie mögliche positive Effekte durch die Fermentation von Zuckern durch im Biofilm integrierte Probiotika. Sie konnten zeigen, dass die Probiotika *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 334 und *LGG* in einem Multispeziesbiofilm mit *SM* in der Lage sind, die Produktion extrazellulärer Polysaccharide von *SM* signifikant zu reduzieren. Vermutlich kam es zu dieser Reduktion durch die Verstoffwechslung der verfügbaren Saccharose und dem daraus resultierenden Substratzug für *SM* (Lee und Kim, 2014). Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse aus einer Studie mit einem künstlichen Mundmodell, bei dem *LGG* bei gemeinsamer Kultivierung mit *SM* keine inhibitorischen Effekte auf die Kariogenität zeigte, sondern zu einem höheren Mineralverlust führte als eine Monokultur von *SM* (Schwendicke et al., 2014).

3.3.3. Adhäsion oraler Mikroorganismen an die Zahnhartsubstanz

3.3.3.1. Physiologie der bakteriellen Adhäsion

Die Adhäsion von Bakterien an die Zahnhartsubstanzen und die Bildung eines stabilen Biofilms sind möglich, da orale Glattflächen im Gegensatz zur Schleimhaut ihre oberflächliche Schicht nicht absondern (Desquamation) (Gibbons und van Houte, 1971). Eine dauerhafte Anhaftung ist bedeutend leichter zu erreichen als bei Geweben, die ihre oberflächlichen Zellschichten ständig erneuern, wie z.B. gingivales Epithel (Skougaard, 1970). Die Zahnhartsubstanzen sind von einem dünnen Speichelfilm benetzt, der sogenannten „erworbenen Pellikel“. Diese entsteht durch die selektive Adsorption von organischen Ablagerungen aus Glykoproteinen des Speichels (Ericson, 1967; Hay, 1967; Lendenmann et al., 2000). Negativ geladene organische Speichelbestandteile werden von den positiv geladenen Hydroxylapatitkristallen angezogen (Gibbins et al., 2014). Der erste Schritt der Biofilmbildung auf oralen Glattflächen ist die Bindung residenter Bakterien der Mundflora an die Pellikel. Zu den Erstbesiedlern oraler Glattflächen gehören neben Streptokokken wie z.B. *SS* und *Streptococcus oralis* auch *Actinomyces*, *Haemophilus* und *Neisseria* (Nyvad und Kilian, 1987).

Die Bakterien können über schwache hydrophobe oder elektrostatische Kräfte, z.B. Van-der-Waals-Kräfte, an die Oberflächen binden. Für gewöhnlich sind diese Kräfte aber nicht ausreichend, um den Selbstreinigungsmechanismen der Mundhöhle zu entgehen, wodurch eine dauerhafte Anhaftung über diesen Adhäsionsmechanismus nicht möglich ist. Die initiale und dauerhafte Adhärenz an Glattflächen gelingt vermutlich über ein Erkennungssystem in der Bakterienwand, welches auf Rezeptoren in der Pellikel passt. Die Bakterien verfügen an ihrer Oberfläche über lektinartige oder hydrophobe Adhäsine, die mit komplementären Rezeptormolekülen auf den Wirtsoberflächen reagieren (Gibbons, 1989). Die primäre Adhäsion von *SM* wird über den spezifischen Rezeptor gp-340 (siehe S. 17) vermittelt (Prakobphol et al., 2000). Eine Anhaftung von Mikroorganismen ohne physikalische oder stereochemische Kräfte ist in geschützten Bereichen wie Fissuren, Entwicklungsdefekten oder anderen Rauigkeiten der Zahnoberflächen ebenfalls möglich (Fejerskov et al., 1984).

3.3.3.2. Bedeutung der Adhäsion an Zahnhartsubstanz für Probiotika

Um die positiven Effekte probiotischer Stämme nutzen zu können, muss gewährleistet sein, dass nach dem Konsum eines probiotischen Produkts eine Kolonisation in der

oralen Mundhöhle stattfindet. Dass Bakterien zur Kolonisation des oralen Habitats befähigt sind, ist eine der Grundvoraussetzungen in der „Replacement-Theorie“ (Burton et al., 2011). Naheliegender Kolonisationsort in der Mundhöhle beim Einsatz probiotischer Bakterien zur Prävention einer Karies ist die Oberfläche der Zahnhartsubstanz. Zur Therapie einer bestehenden Karies ist die Kolonisation bzw. Integration in einen bestehenden Biofilm ebenfalls erstrebenswert. Für verschiedene kommerziell erhältliche Probiotika (*LGG*, *Lactobacillus paracasei* F-19 (F-19), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (LA-5), *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB-12 (BB-12)) konnte schon in Laborversuchen nachgewiesen werden, dass sie an mit Speichel überzogene Hydroxylapatit-Oberflächen adhäreren können (Busscher et al., 1999; Haukioja et al., 2006; Stamatova et al., 2009; Schwendicke et al., 2017). Dennoch gibt es keine Evidenz dafür, dass probiotische Mikroorganismen auch in vivo die Mundhöhle kolonisieren und sich dauerhaft in den dentalen Biofilm integrieren können. Studien, in denen Testpersonen für eine längere Zeit probiotische Produkte konsumiert haben, legen nahe, dass bei Erwachsenen eine permanente Integration in die dentale Plaque (Busscher et al., 1999; Krasse et al., 2006) oder den Speichel (Meurman et al., 1994; Çaglar et al., 2009; Hasslöf et al., 2013) unwahrscheinlich ist. Die vorübergehende Kolonisation nur für den Zeitraum der Einnahme des probiotischen Produkts hingegen scheint möglich (Montalto et al., 2004; Krasse et al., 2006; Yli-Knuuttila et al., 2006). Es ist offensichtlich, dass es Unterschiede sowohl im Adhäsionspotential zwischen verschiedenen Bakterien als auch bei den Wirtsbedingungen unterschiedlicher Individuen gibt (Busscher et al., 1999; Haukioja et al., 2006; Petti et al., 2001).

Die Befähigung von Probiotika zur Adhäsion an die Pellikel dentaler Oberflächen kann dazu beitragen, dass die Bindungskapazität residenter oraler Streptokokken sinkt. Haukioja et al. haben gezeigt, dass verschiedene Laktobazillen an das Speichelprotein gp-340 (siehe S.17) binden können und dadurch die Bindungsstellen für *SM* besetzen, was in einer signifikanten Reduktion gebundener *SM* Stämme resultierte. Nur Bakterien, die an S-HA binden konnten, waren auch in der Lage, die Adhäsion anderer Bakterien zu beeinflussen (Haukioja et al., 2008). Vielversprechend könnte diese Eigenschaft zur Prävention von Karies bei Kindern sein. Bei Kindern scheint der Konsum von Milch mit *Lactobacillus rhamnosus* GG das Kariesrisiko und die Menge an *SM* in der Plaque zu verringern (Nase et al., 2001). Es ist bekannt, dass eine geringere Adhäsion von *SM* bei Kindern so zu einer Kariesreduktion führen kann (Alaluusua und Renkonen, 1983; Tenovuo et al., 1992).

4. Fragestellung

Eine probiotische Therapie könnte für die Prävention und Behandlung von Karies sinnvoll sein. Ist eine Integration der Probiotika in den Biofilm möglich, könnten die daraus resultierenden positiven Effekte (z.B. Verdrängung/Reduzierung kariogener Bakterien, Substratzug für kariogene Bakterien, Neutralisierung kariogener Säuren durch Ammoniak via ADS-System) vor Karies schützen. Es gibt eine Vielzahl von In-vitro-Studien, die bei verschiedenen probiotischen Stämmen positive Eigenschaften zeigen konnten. Derzeit sind aber keine Studien verfügbar, die relevante Stoffwechseleigenschaften aktuell verfügbarer und vielversprechender Probiotika miteinander verglichen haben. Insbesondere für die ADS-Aktivität liegen für die meisten Probiotika keine Daten vor. Um in weiteren In-vitro- und klinischen Studien den Effekt von Probiotika auf Karies zu untersuchen, ist es notwendig, probiotische Stämme mit vielversprechenden Stoffwechseleigenschaften zu identifizieren. Gegenstand der durchgeführten Untersuchungen war es daher zu evaluieren, wie sich die ADS-Aktivität, die Säureproduktion nach Zugabe von Saccharose und das Adhäsionsverhalten an S-HA zwischen verschiedenen Probiotika unterscheidet. Relevante Eigenschaften verschiedener Bakterienstämme sollten erfasst werden, um deren jeweiliges Potential zur Kariesbehandlung oder -prävention beurteilen zu können.

Die Nullhypothesen lauteten:

1. Die ADS-Aktivität verschiedener probiotischer Bakterienstämme unterscheidet sich nicht voneinander.
2. Der pH-Wert-Abfall unterscheidet sich nicht zwischen den Bakterienstämmen nach Inkubation mit Saccharose über 24, 48 und 72 Stunden.
3. Die Bakterienstämme haben kein unterschiedliches Adhäsionsverhalten an S-HA.

5. Material und Methoden

In drei getrennten Versuchen wurden für neun potenziell probiotische Stämme und den Referenzstamm *SM* verschiedene Parameter bestimmt. Untersucht wurden die ADS-Aktivität, der pH-Wert-Abfall nach Inkubation mit Saccharose und das Adhäsionsvermögen an S-HA.

5.1. Probiotische Stämme

In der Studie wurden folgende probiotischen Stämme untersucht:

- *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 (DSM 20567, DSMZ)
- *Streptococcus oligofermentans* ATCC 51100 (DSM 8249, DSMZ)
- *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Dänemark)
- *Lactobacillus paracasei* F-19 (Arla Dairy, Stockholm, Schweden)
- *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (Valio Dairy, Helsinki, Finnland)
- *Lactobacillus rhamnosus* LB 21 (Essum AB, Umea, Schweden)
- *Lactobacillus reuteri* DSM 17928 (BioGaia, Stockholm, Schweden)
- *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289 (BioGaia, Stockholm, Schweden)
- *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB-12 (Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Dänemark)

Als Referenzstamm mit bekannten kariogenen Eigenschaften diente:

- *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (DSM 20523, DSMZ)

5.1.1. Auswahl der probiotischen Stämme

Im Rahmen einer nichtsystematischen Literaturrecherche (August 2016) wurden relevante probiotische Stämme identifiziert. Jedem der ausgewählten Stämme sollten eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften in einer oder mehreren Studien nachgewiesen worden sein: antibakterielle Wirksamkeit gegen *SM* oder *Streptococcus sobrinus*, Adhäsion an Schmelz, hohe ADS-Aktivität oder Kolonisationsfähigkeit der Mundhöhle. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Studien ihre Ergebnisse in Rahmen von In-vitro- oder In-vivo-Untersuchungen generiert hatten. Oft zitierte Stämme, die in anderen Studien als potenziell kariogen identifiziert wurden, bspw. *Lactobacillus plantarum* (Haukioja et al., 2008b; Hedberg et al., 2008), wurden ausgeschlossen. Eine Ausnahme bildete LGG, dem zwar in mehreren Studien ein kariogenes Potential nachgewiesen werden konnte (Schwendicke et al., 2014; Hedberg et al., 2008), der aber

aufgrund seines bereits häufigen Einsatzes in der probiotischen Therapie eingeschlossen wurde. Folgende Stämme hätten zwar die Kriterien zum Einschluss in die Untersuchung erfüllt, wurden aber nach entsprechender Nachfrage bei den vermarktenden Herstellern nicht für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt: *Streptococcus salivarius* M18 (BLIS Technologies, Dunedin, Neuseeland), *Lactobacillus casei* shirota (Yakult, Tokyo, Japan) und *Lactobacillus casei* DN114 (Danone, Paris, Frankreich).

5.1.2. Stammhaltung und Kultivierung der probiotischen Stämme

Die Stämme wurden je nach Verfügbarkeit bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bestellt oder nach Anfrage vom kommerziellen Hersteller bereitgestellt. Zur Archivierung wurden die Stämme nach Erhalt auf Agar-Platten mit sterilen Impfösen ausgestrichen und aerob bei einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid (CO₂-Inkubator, Binder, Tuttlingen, Deutschland) bzw. anaerob (AnaeroGen 2.5 l, Oxoid, Wessel, Deutschland) inkubiert. Nach zweitägiger Kultivierung wurden die Kolonien mit sterilen Impfösen geerntet und nach Anleitung des Herstellers im Stammhaltungssystem (Cryobank Bead System, Copan Diagnostics, Murrieta, CA, USA) archiviert und bei - 80 °C eingefroren.

Die für die Versuche benötigten Bakterien wurden mit einer sterilen Impföse aus dem Stammhaltungssystem entnommen und auf Agar-Platten ausgestrichen und entsprechend der jeweiligen benötigten optimalen Wachstumsbedingungen kultiviert (Tab.1). *BB-12* wurde auf einem Columbia-Agar mit Schafblut (Oxoid) unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Alle Streptokokken-Stämme wurden auf einem Columbia-Agar mit Schafblut unter aeroben Bedingungen bei einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid kultiviert. Alle Laktobazillen-Stämme wurden auf einem De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)-Agar (Oxoid) kultiviert. Mit Ausnahme von *Lactobacillus reuteri* DSM 17928 (*LRDSM*), *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289 (*LRPTA*) und *LA-5* (anaerobe Bedingungen) wurden alle Laktobazillen-Stämme unter aeroben Bedingungen kultiviert. Alle Stämme wurden bei 37° C für 48 Stunden inkubiert. Die Agar-Platten wurden nach erfolgreicher Kultivierung bei 2° C gelagert. Die Platten wurden maximal zwei Wochen benutzt, um Übernachtskulturen für die verschiedenen Versuchsaufbauten anzusetzen (Abb. 6). Nach spätestens zwei Wochen wurden neue Platten mit Einzelkolonien ausgestrichen und unter denselben Bedingungen kultiviert. Nach maximal zehn Passagen wurden die Platten verworfen und der jeweilige Stamm frisch aus dem Stammhaltungssystem kultiviert.

Tab. 1 Kultivierung der Stämme im Brutschrank

Stamm	Kürzel	Agar-Platte	Atmosphäre
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	SM	Schafblut	Aerob 5 % CO ₂
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	SS	Schafblut	Aerob 5 % CO ₂
<i>Streptococcus oligofermentans</i> ATCC 51100	SO	Schafblut	Aerob 5 % CO ₂
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	LA-5	MRS	Anaerob
<i>Lactobacillus paracasei</i> F-19	F-19	MRS	Aerob 5 % CO ₂
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	LGG	MRS	Aerob 5 % CO ₂
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB 21	LB21	MRS	Aerob 5 % CO ₂
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17928	LRDSM	MRS	Anaerob
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 5289	LRPTA	MRS	Anaerob
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> BB-12	BB-12	Schafblut	Anaerob

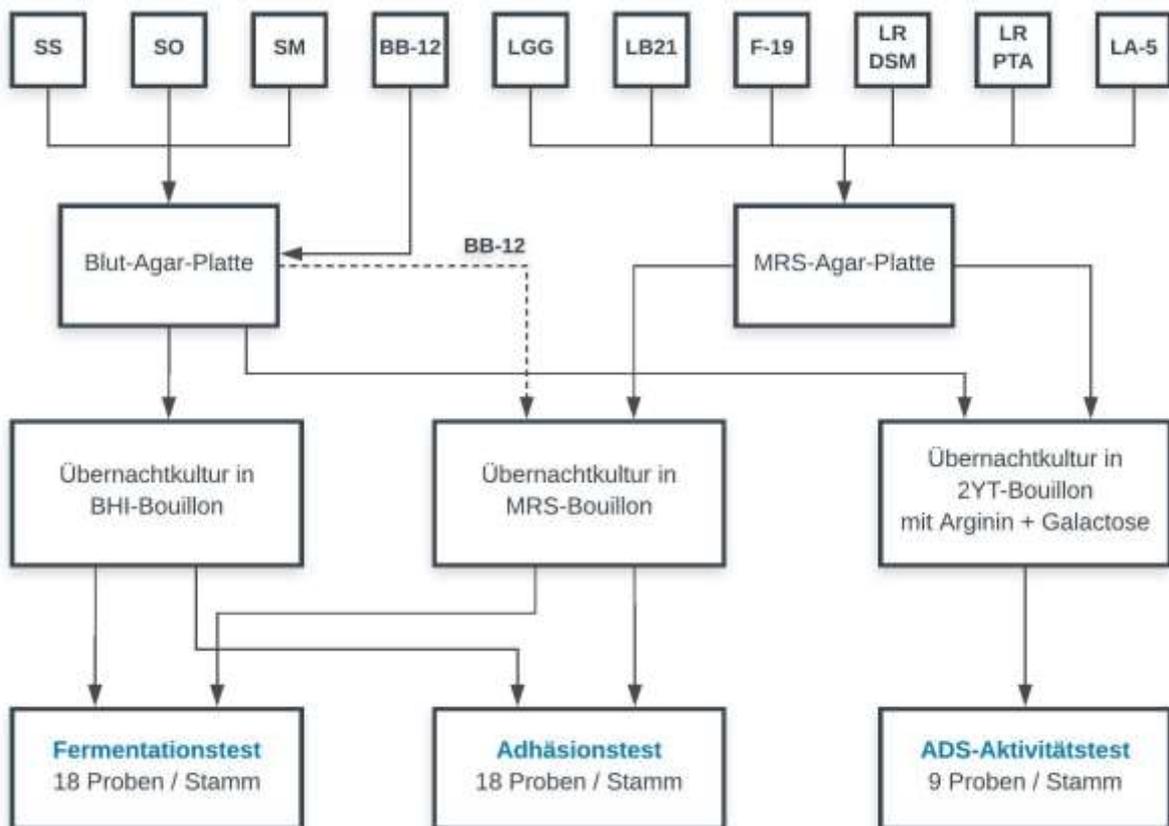


Abb. 6 Kultivierung der Bakterienstämme für verschiedene Untersuchungen

BB-12 wurde vorbereitend für den Fermentations- und Adhäsionstest auf Blut-Agar Platten kultiviert, aber danach für die Übernachtskultur in MRS-Bouillon überführt (siehe gestrichelte Linie)

5.2. ADS-Aktivität

Die ADS-Aktivität wurde gemessen, indem die Citrullinproduktion nach Argininzugabe bestimmt wurde (Abb. 7). Das ADS-Aktivitätslevel der Bakterienstämme bezieht sich auf die gebildete Menge Citrullin (in nmol) in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Bakterien (in mg) pro Zeiteinheit (in min). Von jedem Stamm wurden neun Proben zur Bestimmung der ADS-Aktivität genutzt.

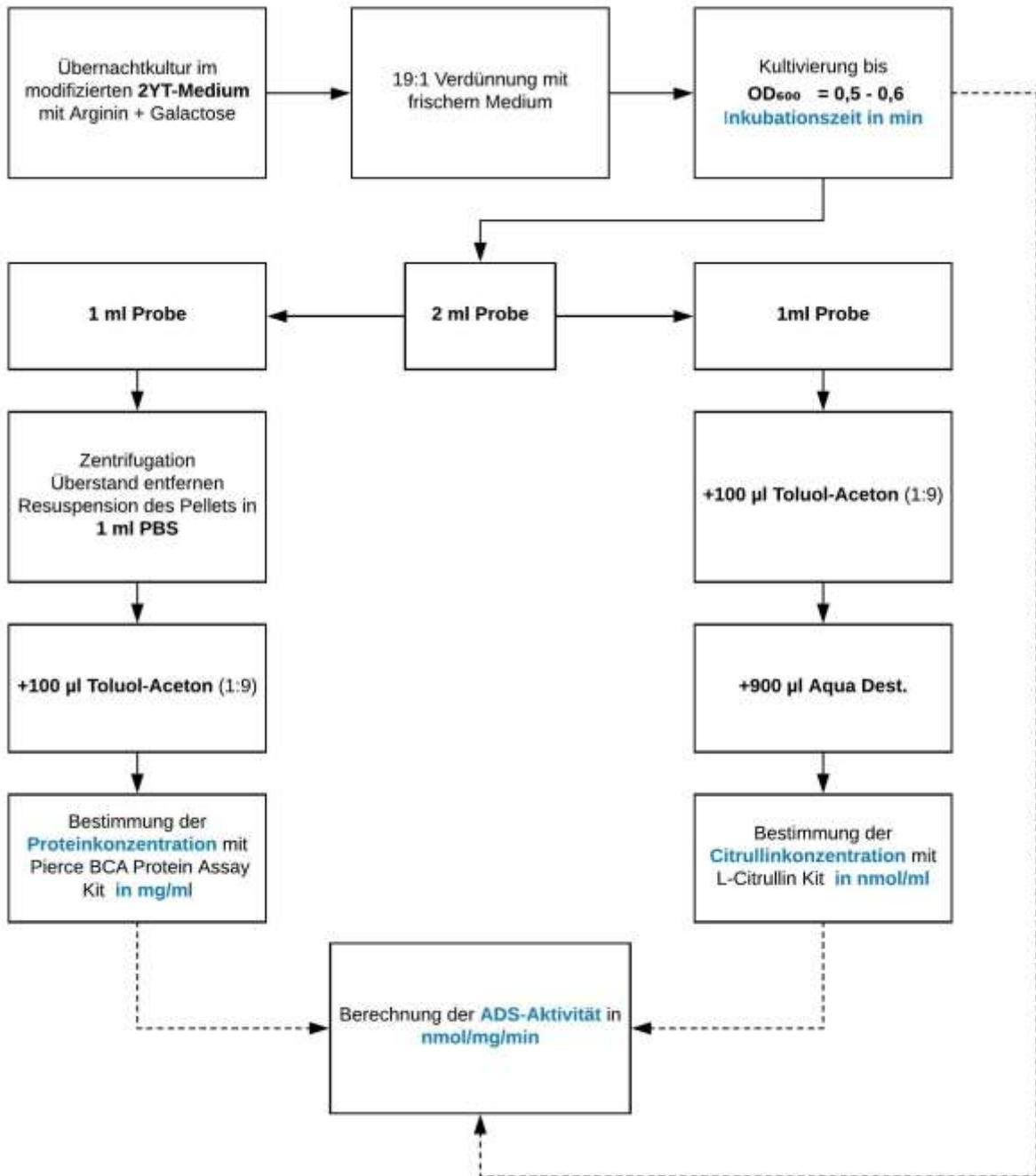


Abb. 7 Flow-Chart: Bestimmung der ADS-Aktivität

5.2.1. Kultivierung

Für die Übernachtskulturen wurde ein modifiziertes 2YT-Medium (10 Mm Arginin, 25 Mm Galactose) genutzt. Zur Herstellung wurde handelsübliches granuliertes 2YT-Medium (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben angemischt und durch Autoklavieren sterilisiert. L-Arginin Monohydrochlorid (Carl Roth) und D(+)-Galactose (Carl Roth) wurden in destilliertem Wasser (Ampuwa Spüllösung Plastipur, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) gelöst und mittels eines Filtrationsgeräts mit PES-Membran (Ø 90 mm, Porengröße 0,2 µm, 1000 ml; Carl Roth) steril filtriert und danach in entsprechenden Verhältnissen (10 Mm Arg, 25 Mm Gal) zum 2YT-Medium hinzugefügt. Einzelne Kolonien wurden von den entsprechenden Agar-Platten mit sterilen Impfösen gesammelt und in 5 ml modifiziertem 2YT-Medium (10 Mm Arginin, 25 Mm Galactose) zur Übernachtskultur bei 37° C in einer aeroben 5 % CO₂-Atmosphäre angesetzt. Eine Übernachtskultur entspricht einer Probe.

5.2.2. Verdünnen der Übernachtskulturen

Die Übernachtskulturen wurden nach ca. 12 - 16 Stunden mit frischem 2YT-Medium (10 Mm Arginin, 25 Mm Galactose) im Verhältnis 19 : 1 verdünnt. Jeweils 0,5 ml Übernachtskultur wurden mit 9,5 ml frischem Medium verdünnt. Das frische 2YT-Medium wurde zuvor bereits auf 37° C erwärmt. Die Bakterienzellsuspensionen wurden unter gleichen Bedingungen wie die Übernachtskulturen weiter kultiviert (37° C, 5 % CO₂, aerob).

5.2.3. Inkubationszeit

Die Suspensionen wurden solange kultiviert bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) einen Bereich von 0,5 - 0,6 erreicht hatte. Die optische Dichte der Suspensionen wurde halbstündlich in UV-Küvetten (mikro, 70 µl; Brand, Wertheim, Deutschland) mit einem Photometer (Biophotometer plus 6132; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ermittelt. Die Zeit nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurde in Minuten erfasst und anschließend wurde sofort mit der Probenvorbereitung begonnen.

5.2.4. Probenvorbereitung

Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 - 0,6 wurden 2 ml der Bakterienzellsuspension abpipettiert. Die Probenvorbereitung brauchte jeweils 1 ml für die Bestimmung der Citrullin- und 1 ml für die Bestimmung der Protein-Konzentration.

Für die Herstellung der Probe zur Bestimmung der Protein-Konzentration wurde 1 ml der zuvor 2 ml abpipettierten Bakterienzellsuspension genommen und zentrifugiert (1370 g, 10 min, 20°C; Centrifuge 5430 R, Eppendorf). Der Überstand wurde entfernt und das Bakterien-Pellet in 1 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) resuspendiert. Durch die Trennung des Bakterien-Pellets vom Kultivierungsmedium wurde sichergestellt, dass in der späteren Bestimmung der Protein-Konzentration sich die im Medium enthaltenen Proteine nicht verfälschend auf die Testergebnisse auswirkten und nur der Gesamtproteingehalt der permeabilisierten Bakterienzellen gemessen wurde. Danach folgte die Zugabe von 100 µl Toluol-Aceton (1 : 9) zur Permeabilisierung der Zellen. Das Gemisch wurde für vier Minuten stark durchmischt (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Bruchsal, Deutschland).

Zur Herstellung der Probe für die Bestimmung der Citrullin-Konzentration wurden die übrig gebliebenen 1 ml der Bakterienzellsuspension mit 100 µl Toluol-Aceton (1 : 9) angemischt und für vier Minuten stark durchgemischt. Danach wurden 900 µl Aqua Dest. hinzugefügt und die Lösung erneut durchgemischt. Durch die Zugabe von Toluol-Aceton kommt es zur Permeabilisierung der Zellen und konsekutiv zum Aufschluss und zur Freisetzung des intrazellulären Citrullins. Nach Abschluss der Probenvorbereitung wurden diese bis zur Messung der Citrullin- und Proteinkonzentrationen bei - 80° C gelagert.

5.2.5. Bestimmung der Protein- und Citrullin-Konzentration

Die vorbereiteten Proben wurden aufgetaut und die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte nach Herstelleranleitung mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und Albumin als Standard. Zur Bestimmung der Werte wurde das „Standard Test Tube Protocol“ (Working Range = 20 - 2,000 µg/ml) gewählt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte photometrisch (Biophotometer plus 6132; Eppendorf) in Küvetten (10x4x45 mm, Sarsted AG& Co.).

Die Bestimmung der Citrullin-Konzentration erfolgte nach Herstelleranleitung mit dem L-Citrullin Kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland). Die photometrische Bestimmung im Plattenreader (Thermo Scientific Multiscan Go, Thermo Fisher Scientific)

erfolgte in 96-well Platten (Nunc LockWell Maxisorp, Thermo Fisher Scientific) (Abb. 8). Die Verdünnungsschritte bei der Probenvorbereitung wurden bei der Mengenermittlung berücksichtigt.

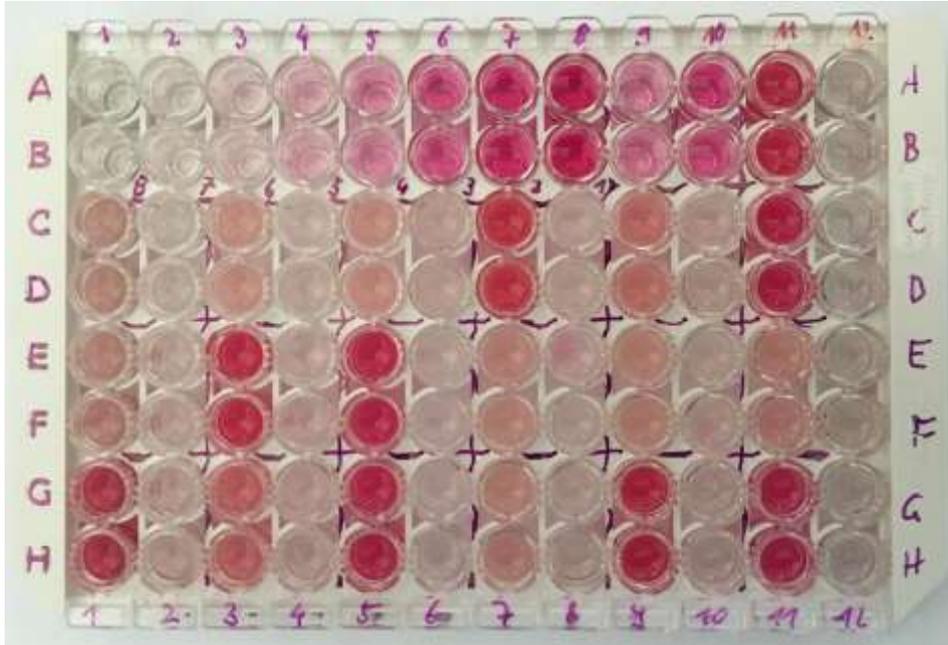


Abb. 8 Photometrische L-Citrullin Bestimmung in einer 96-well Platte

A1-8, B1-8: Standardreihen

A9, B9: Kontrolle 1 mit bekannter Citrullin Konzentration

A10, B10: Kontrolle 2 mit bekannter Citrullin Konzentration

Alle anderen: Proben in Doppelwertbestimmung

5.2.6. Rechnerische Bestimmung der ADS-Aktivität

Formel zur Errechnung der ADS-Aktivität:

$$ADS - \text{Aktivität (in nmol/mg / min)} = \frac{\text{Citrullinkonzentration (in nmol)}}{\text{Proteinkonzentration (in mg) x Zeit (in min)}}$$

5.3. Zuckerfermentation

Zur Beurteilung der Kariogenität der Bakterienstämme wurde nach Zugabe von Saccharose die Säureproduktion über den pH-Abfall mittels dem pH-Indikator Bromkresolpurpur nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden bestimmt (Abb. 9). Von jedem Stamm wurden pro Versuchsdurchlauf sechs Proben genommen. Der Versuch wurde zwei Mal wiederholt.

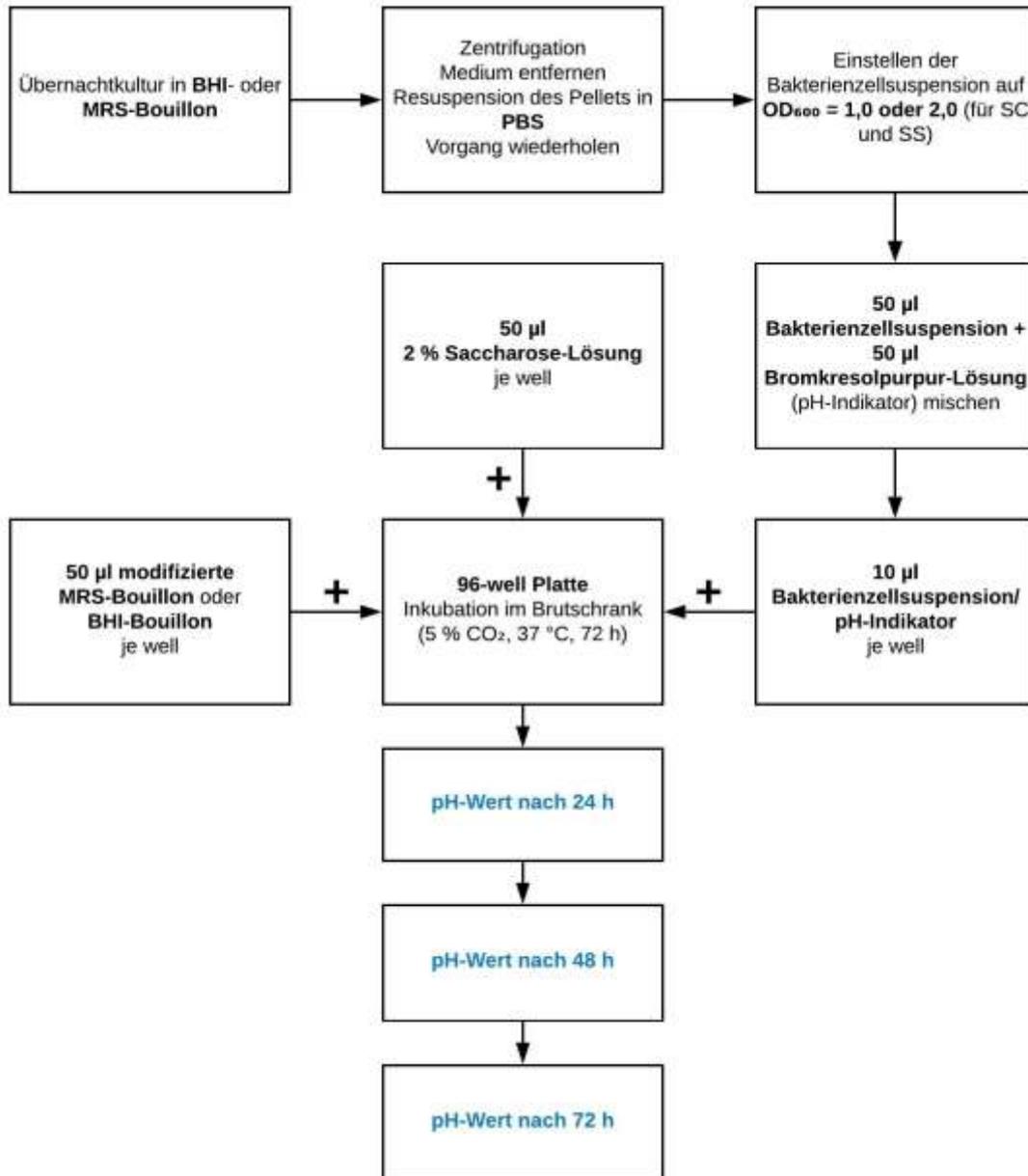


Abb. 9 Flow-Chart: Fermentationstest

5.3.1. Kultivierung

Die für die Kultivierung benutzten Nährmedien wurden nach Herstelleranleitung angemischt und durch Autoklavieren sterilisiert. Einzelne Kolonien wurden mit sterilen Impfösen von entsprechenden Agar-Platten genommen und zur Übernachtskultur in MRS bzw. BHI-Bouillon überführt (siehe Abb.6). Alle Laktobazillen-Stämme und *BB-12* wurden in MRS-Bouillon (Carl Roth) kultiviert, während alle Streptokokken-Stämme in BHI-Bouillon (Carl Roth) kultiviert wurden.

5.3.2. Waschen und Einstellen der optischen Dichte

Die Übernachtskulturen der Bakterien wurden mittels Zentrifugation (1370 g, 10 min, 20° C; Centrifuge 5430 R, Eppendorf) gewonnen, in zwei Durchgängen mit PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert, um die OD₆₀₀ in Küvetten (10x4x45 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) auf 1,0 einzustellen. Es wurde im Vorfeld die Lebendzellzahl mittels Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU) experimentell ermittelt, so dass bei einer OD₆₀₀ von 1,0 in PBS für alle Stämme außer SS und SO die Bakterienzellzahl $1,5 (\pm 1) \times 10^8$ Zellen/ml betrug. Für SS und SO wurde eine OD₆₀₀ von 2,0 eingestellt, um eine Bakterienzellzahl von $1,5 (\pm 1) \times 10^8$ Zellen/ml zu erreichen. Die Bakterienzellsuspensionen wurden sofort im Fermentationstest genutzt.

5.3.3. Herstellung modifizierter Nährmedien für Fermentationstest

Für die Bestimmung der Säureproduktion wurden die in PBS resuspendierten Bakterienstämme zu frischem Medium hinzugefügt. Um eine Verfälschung durch im Medium enthaltene Kohlenhydrate zu verhindern, wurde eine modifizierte MRS-Bouillon hergestellt (Tab. 2). Das Herstellen einer modifizierten BHI-Bouillon war aufgrund fehlender Verfügbarkeit bestimmter Inhaltsstoffe nicht möglich. Deshalb wurde in der selbst hergestellten MRS-Bouillon Glukose nicht komplett eliminiert, sondern der gleiche Gehalt wie in handelsüblicher BHI-Bouillon gewählt (2 g/l). Dieser Gehalt ist bedeutend geringer als in handelsüblicher MRS-Bouillon (20 g/l). Die hergestellte modifizierte Bouillon wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

Tab. 2 Zusammensetzung der modifizierten MRS-Bouillon

Supplement	Konzentration (in g/l)
Pepton	10
Hefeextrakt mikro-granuliert	5
Fleischextrakt, pulv.	10
di-Kaliumhydrogenphosphat	2
Natriumacetat Trihydrat	0,5
tri-Ammoniumcitrat	2
Magnesiumsulfat Heptahydrat	0,2
Mangan (III)-sulfat-Monohydrat	0,05
D(+)-Glucose	2

5.3.4. Testdurchführung

Vorbereitend wurde D(+)-Saccharose (Carl Roth) in eine 2 % wässrige Lösung (Ampuwa Spüllösung Plastipur, Fresenius) gebracht, um als Kohlenhydratlösung für den Test zu fungieren. Als pH-Indikator wurde eine 2 % wässrige Lösung von Bromkresolpurpur Natriumsalz (Carl Roth) hergestellt. Nach dem Anmischen wurden beide Lösungen steril filtriert (Millex Filter Unit 0,22 µm, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland.). Der Versuch wurde in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt (Falcon Non-Tissue Culture Treated Plate, Thermo Fisher Scientific). 50 µl der entsprechenden Bouillon (modifiziertes MRS oder BHI) wurden gemischt mit jeweils 50 µl der 2 % Saccharose Lösung. Die pH-Indikator-Lösung wurde 1 : 1 mit jedem der Bakterienstämme gemischt und 10 µl des Gemisches davon zum entsprechenden Medium mit Saccharose-Zusatz hinzugefügt. Als Negativ-Kontrolle wurde PBS ohne Bakterienkulturen mit dem pH-Indikator gemischt. Die Platten wurden mit Folie (Acetate Foil, Sarstedt) abgeschlossen um ein Verdunsten der Lösungen zu verhindern. Es folgte die Inkubation im Brutschrank unter aeroben Bedingungen bei einer Atmosphäre von 5 % CO₂ bei 37° C für 72 Stunden.

5.3.5. Optische Bestimmung des pH-Wertes

Nach 24, 48 und 72 Stunden erfolgte die optisch-visuelle Untersuchung auf Farbveränderungen (Abb. 10 a - d). Der Indikator färbt sich violett bei einem pH-Wert > 6,8 und gelb bei einem pH-Wert < 5,2. Dazwischen liegende Farben deuten auf einen pH-Wert im Bereich zwischen 5,2 und 6,8 hin. Für den Versuch galt ein pH > 6,8 als negative Reaktion, ein pH-Wert < 5,2 als positive. Alle pH-Werte dazwischen galten als schwache Reaktion.

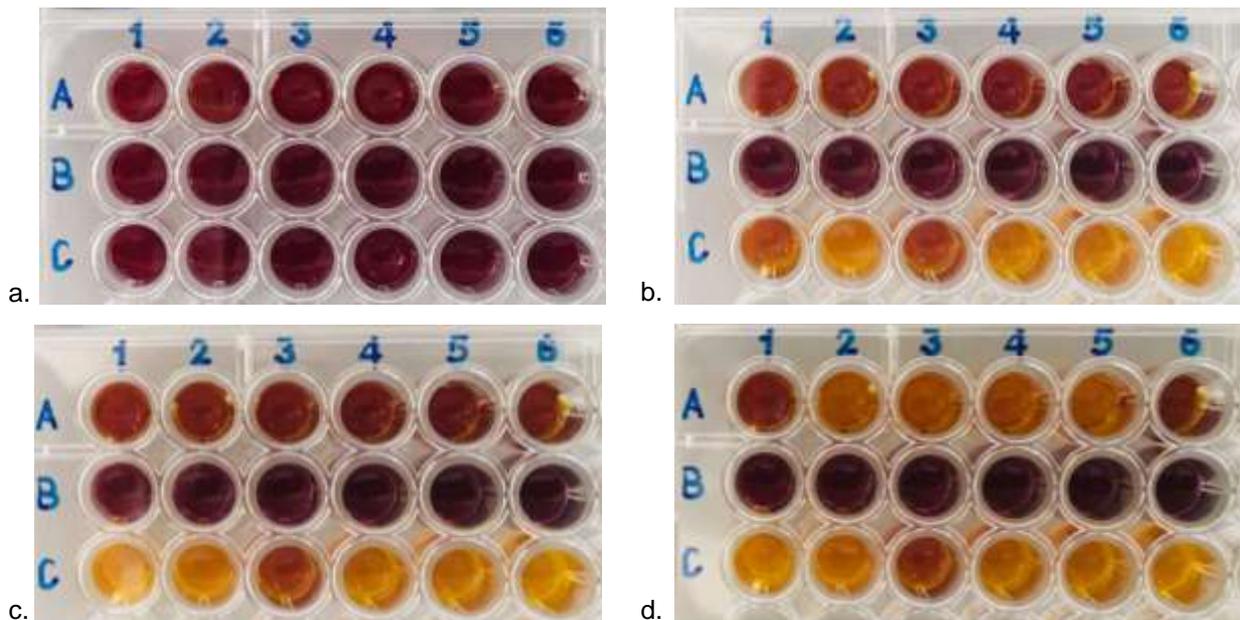


Abb. 10a-d Fermentationstest mit 3 Stämmen und jeweils 6 Proben

Reihe A = LGG, Reihe B = SO, Reihe C = SM.

Nach Inkubation der Stämme mit Saccharose verstoffwechseln kariogene Bakterien den Zucker zu einer großen Menge an Laktat. Dadurch sinkt der pH-Wert und der pH-Indikator Bromkresolpurpur ändert seine Farbe von violett zu gelb. Die Veränderungen sind deutlich zu erkennen und in drei Farbbereiche zu unterscheiden: violett, gelb und Farbbereiche dazwischen (orange).

Abb. 10a Fermentationstest zum Zeitpunkt $t = 0$ h

Alle Proben sind negativ, da der pH-Wert des Mediums über pH 6,8 ist und noch keine Säuren gebildet wurden.

Abb. 10b Fermentationstest zum Zeitpunkt $t = 24$ h

Proben A 1-6, C 1,3 = schwache Reaktion; B 1-6 = negative Reaktion; C 2, 4-6 = positive Reaktion

Abb. 10c Fermentationstest zum Zeitpunkt $t = 48$ h

Proben A 1-6, C 3 = schwache Reaktion; B 1-6 = negative Reaktion; C 1,2, 4-6 = positive Reaktion

Abb. 10d Fermentationstest zum Zeitpunkt $t = 72$ h

Proben A 1, 6; C 3 = schwache Reaktion; B 1-6 = negative Reaktion; A 2-5, C 1,2, 4-6 = positive Reaktion

5.4. Adhäsion an S-HA

Die Bestimmung des Adhäsionsvermögens der Bakterienstämme erfolgte an speichelüberzogenen Hydroxylapatit (S-HA) Discs. Die adhärten Bakterien wurden mittels Kristallviolett angefärbt und die gefärbten Lösungen wurden photometrisch gemessen. Damit konnte das Adhäsionsvermögen der verschiedenen Bakterien verglichen werden (Abb. 11). In einem Versuchsdurchlauf wurden je sechs Proben pro Stamm analysiert (sechs HAP Discs, eine Disc pro Well). Der Versuch wurde zwei Mal wiederholt.

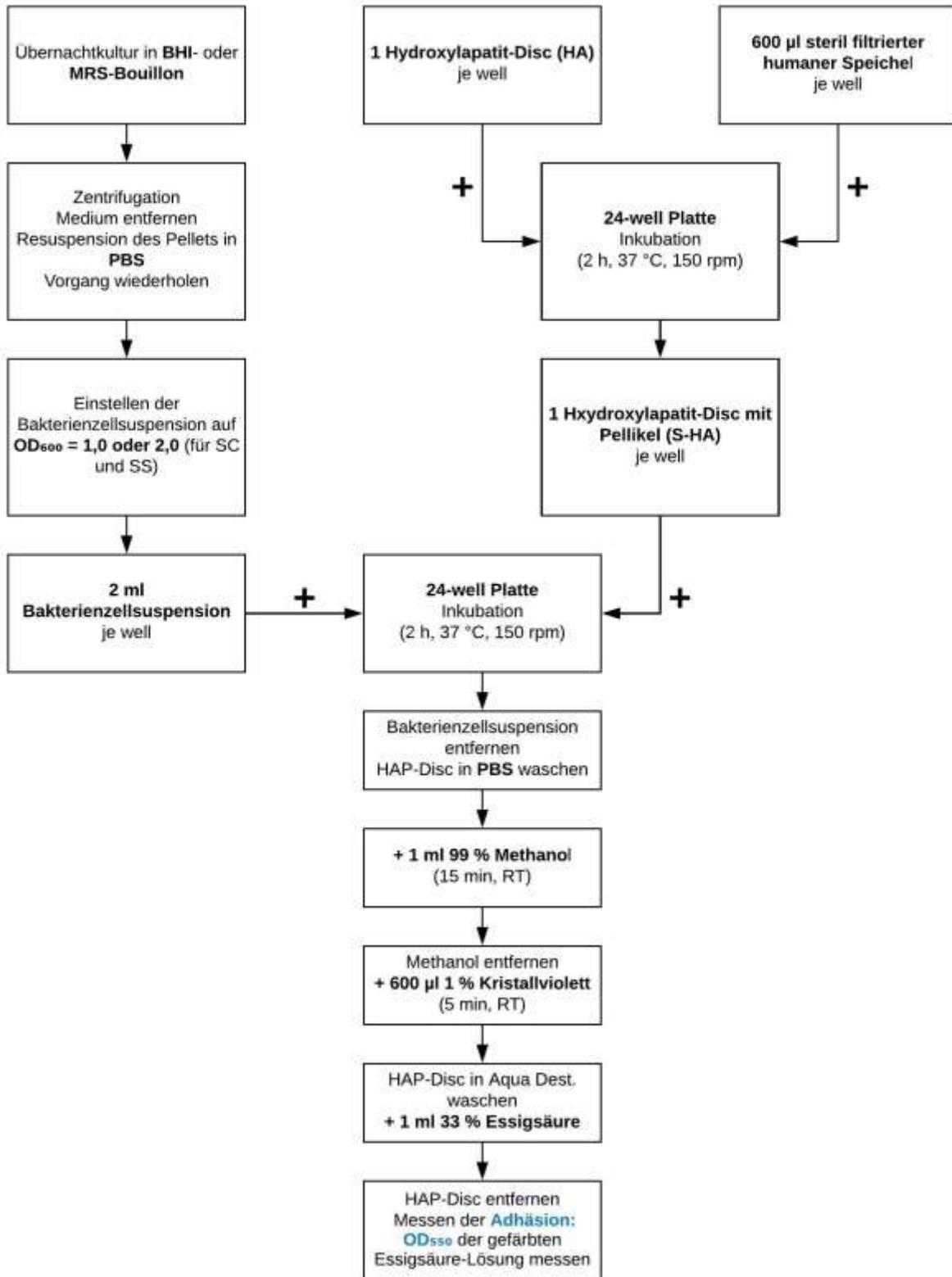


Abb. 11 Flow-Chart: Bestimmung der Adhäsion an S-HA

5.4.1. Probenvorbereitung und Pellikelbildung

Die Hydroxylapatit (HA) Discs (Ceramic Hydroxyapatite Discs Ø 7 mm x 1.8 mm Schichtstärke, Clarkson Chromotography, South Williamsport, PA, USA) wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Der zur Pellikelbildung benötigte menschliche Speichel wurde von zwei kariesfreien Individuen gesammelt. Der gesammelte Speichel wurde zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4° C; Centrifuge 5430 R, Eppendorf) und anschließend der Überstand steril filtriert (Millex Filter Unit 0,22 µm, Merck Millipore). Die Probenvorbereitung wurde in 24-well Mikrotiterplatten durchgeführt (Falcon Non-Tissue Culture Treated Plate, flat bottom, Thermo Fisher Scientific). Je eine HA-Disc pro Well wurde mit 600 µl steril filtriertem Speichel für zwei Stunden bei 37° C unter Rütteln (150 rpm, Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan, Riga, Lettland) inkubiert, um die Bildung eines Pellikels auf der Oberfläche der HA-Discs zu ermöglichen.

5.4.2. Kultivierung

Die für die Kultivierung benutzten Nährmedien wurden nach Herstelleranleitung angemischt und durch Autoklavieren sterilisiert. Einzelne Kolonien wurden mit sterilen Impfösen von entsprechenden Agar-Platten aufgenommen und zur Übernachtskultur in MRS- bzw. BHI-Bouillon überführt (siehe Abb. 6). Alle Laktobazillen-Stämme und *BB-12* wurden in MRS-Bouillon (Carl Roth) kultiviert, während alle Streptokokken-Stämme in BHI-Bouillon (Carl Roth) kultiviert wurden.

5.4.3. Waschen und Einstellen der optischen Dichte

Die Übernachtskulturen der jeweiligen Bakterien wurden mittels Zentrifugation (1370 g, 10 min, 20° C; Centrifuge 5430 R, Eppendorf) eingesammelt, in zwei Durchgängen mit PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert, um die OD₆₀₀ in Küvetten (10 x 4 x 45 mm, Sarstedt) auf 1,0 einzustellen. Es wurde im Vorfeld über CFU-Bestimmung experimentell ermittelt, dass bei einer OD₆₀₀ von 1,0 in PBS für alle Stämme außer *SS* und *SO* die Bakterienzellzahl $1,5 (\pm 1) \times 10^8$ Zellen/ml beträgt. Für *SS* und *SO* wurde eine OD₆₀₀ von 2,0 eingestellt, um eine Bakterienzellzahl von $1,5 (\pm 1) \times 10^8$ Zellen/ml zu erreichen.

5.4.4. Versuchsdurchführung

Der Versuch wurde in 24-well Mikrotiterplatten durchgeführt (Falcon Non-Tissue Culture Treated Plate, flat bottom, Thermo Fisher Scientific). In jedem Well befand sich eine zuvor mit Speichel inkubierte HAP Disc, die mit 2 ml der jeweiligen Bakterienzellsuspension ($1,5 (\pm 1) \times 10^8$ Zellen/ml) für zwei Stunden bei 37° C unter Rütteln (150 rpm) inkubiert wurde. Als Kontrolle wurden HAP Discs in 2 ml PBS inkubiert. Nach zwei Stunden wurden die Bakterienzellsuspensionen entfernt und die HAP Discs in zwei Durchgängen mit PBS gewaschen. Dabei wurde mit einer Pipette vorsichtig nur die Bakterienzellsuspension entfernt. Anschließend wurden die Discs in neue 24-well Mikrotiterplatten überführt und in jedes Well 1 ml 99 % Methanol (Carl Roth) zur Fixierung der adhärierten Bakterien hinzugefügt. Nach 15 Minuten folgte die Entfernung des Methanols und die Discs wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Anfärbung der Bakterien wurde nach Trocknung der Discs 600 µl einer 1 % Kristallviolettlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) genutzt, welche die Kerne der adhärierten Bakterien anfärbt.

Die Färbung dient der Quantifizierung der DNA, welche proportional zur Gesamtzellzahl ist. Die Färbung ist proportional zum Gesamtproteingehalt der Zellen (Prochaska und Santamaria, 1988; Bonnekoh et al., 1989). In einem Vorversuch wurde sichergestellt, dass bei den verschiedenen Bakteriengattungen (Streptokokken, Laktobazillen, Bifidobakterien) der Grad der Färbung gleichermaßen mit der Zellzahl korreliert. Dafür wurde von jeder Gattung exemplarisch ein Stamm gewählt und die Bakterienzellsuspensionen ($OD_{600} = 1,0$) mit Kristallviolett angefärbt. Im weiteren Ablauf wurde das Kristallviolett mit Methanol fixiert und mittels Essigsäure herausgelöst (analog zum Hauptversuch). Die gefärbten Essigsäurelösungen aller drei Bakterienstämme hatten annähernd die gleiche OD_{550} . In parallelen CFU Bestimmungen konnte bestätigt werden, dass gleiche Zellzahlen vorlagen. Erhöhte OD_{550} Werte waren proportional zu erhöhten CFU Werten.

Nach fünf Minuten wurden die Discs entfernt und vorsichtig in Aqua Dest. gewaschen, um anschließend in neue 24-well Mikrotiterplatten transferiert zu werden (Abb. 12a). Nach vollständiger Trocknung der Discs bei Raumtemperatur wurden zu jeder Disc 1 ml einer 33 % Essigsäure (Merck) hinzugegeben. Durch Zugabe der Essigsäure wurde das Färbemittel aus den Bakterienzellen herausgelöst und freigesetzt. Nach Entfernen der Discs blieben optisch zu unterscheidende, violett gefärbte Essigsäurelösungen zurück (Abb. 12b). Mit der Kontrolle wurde identisch verfahren wie mit den Proben.

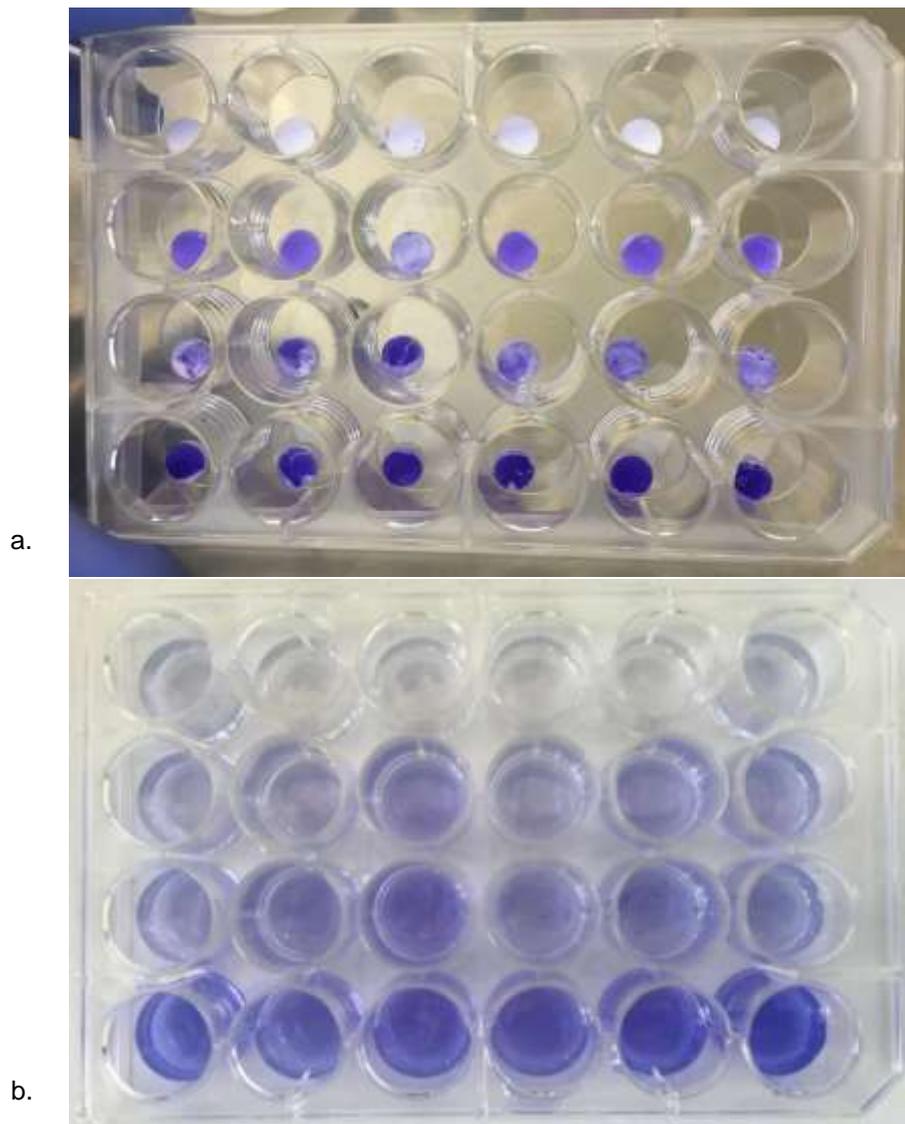


Abb. 12a Inkubierte S-HA Discs nach Anfärbung mit Kristallviolett und Trocknung

Obere Reihe: Kontrollgruppe (Inkubation ohne Bakterien), optisch keine Färbung zu beobachten.

Andere Reihen: je Reihe ein Stamm, optisch unterschiedliche Mengen an angefärbten Bakterien zu unterscheiden.

Abb. 12b Gefärbte Essigsäurelösungen vor Messung der optischen Dichte

Optisch sind die verschieden angefärbten Proben voneinander zu unterscheiden.

5.4.5. Photometrische Bestimmung der Adhäsion

Die OD_{550} der gefärbten Essigsäurelösungen wurde im Photometer (Biophotometer plus 6132; Eppendorf) mit Küvetten (10 x 4 x 45 mm, Sarstedt) gemessen. Von den Ergebnissen der Kontrollen wurde der Mittelwert gebildet und dieser als „Background“ von den Proben abgezogen.

5.5. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Statistik- und Analyse-Software SPSS 22 (IBM, Armonk, NY, USA) verwendet. Die Messwerte der Gruppen wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests und Levene-Tests auf Normalverteilung geprüft. Die Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der ADS-Aktivität, des Adhäsionsvermögens an S-HA-Discs und des pH-Wertes nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) evaluiert. Die Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich aller gemessenen pH-Werte bezogen auf den gesamten Zeitraum (72 Stunden) wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt (repeated measures ANOVA). Da die Varianzen der Daten homogen verteilt waren, wurde der post-hoc Tukey Test durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha < 0,05$ festgelegt.

6. Ergebnisse

6.1. Auswertung der ADS-Aktivität

Die ADS-Aktivität wurde durch die Messung des Umsatzes von Arginin zu Citrullin bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Bakterien ermittelt. Je höher diese Aktivität, desto mehr Arginin wurde abgebaut. Mit Ausnahme von *LA-5* war die Kultivierung aller Stämme im spezifischen Kultivierungsmedium (2YT-Medium) möglich. Da der Tausch auf ein für *LA-5* geeignetes Medium (z.B. MRS) keine Vergleichbarkeit zwischen den Stämmen gewährleisten hätte, konnte für diesen Stamm die ADS-Aktivität nicht ermittelt werden.

Es gab signifikante ($p < 0.05$) Unterschiede bei der gemessenen ADS-Aktivität zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 13). Die erste Nullhypothese wurde damit verworfen. Die höchste ADS-Aktivität wurde für *LRPTA* (Mittelwert (MW): 59,36 [nmol/min/mg]; Standardabweichung (SD): 10,98) ermittelt. Hohe ADS-Aktivitäten hatten außerdem *SO* (MW: 39,42; SD: 9,19), *LRDSM* (MW: 33,16; SD: 10,98) und *SS* (MW: 25,77; SD: 14,64). *LRPTA* hatte eine signifikant höhere ADS-Aktivität als alle anderen Gruppen, gefolgt von *SO* ($p < 0,05$). Die drei probiotischen Stämme *BB-12*, *LGG* und *LB21* sowie *SM* hatten relativ niedrige ADS-Aktivitäten (Spanne der Mittelwerte: 3,53 - 7,06 [nmol/min/mg]). Sowohl bei den Bakterien aus der Gruppe der Streptokokken als auch bei den Laktobazillen konnten sowohl Stämme mit hoher als auch Stämme mit niedriger ADS-Aktivität identifiziert werden.

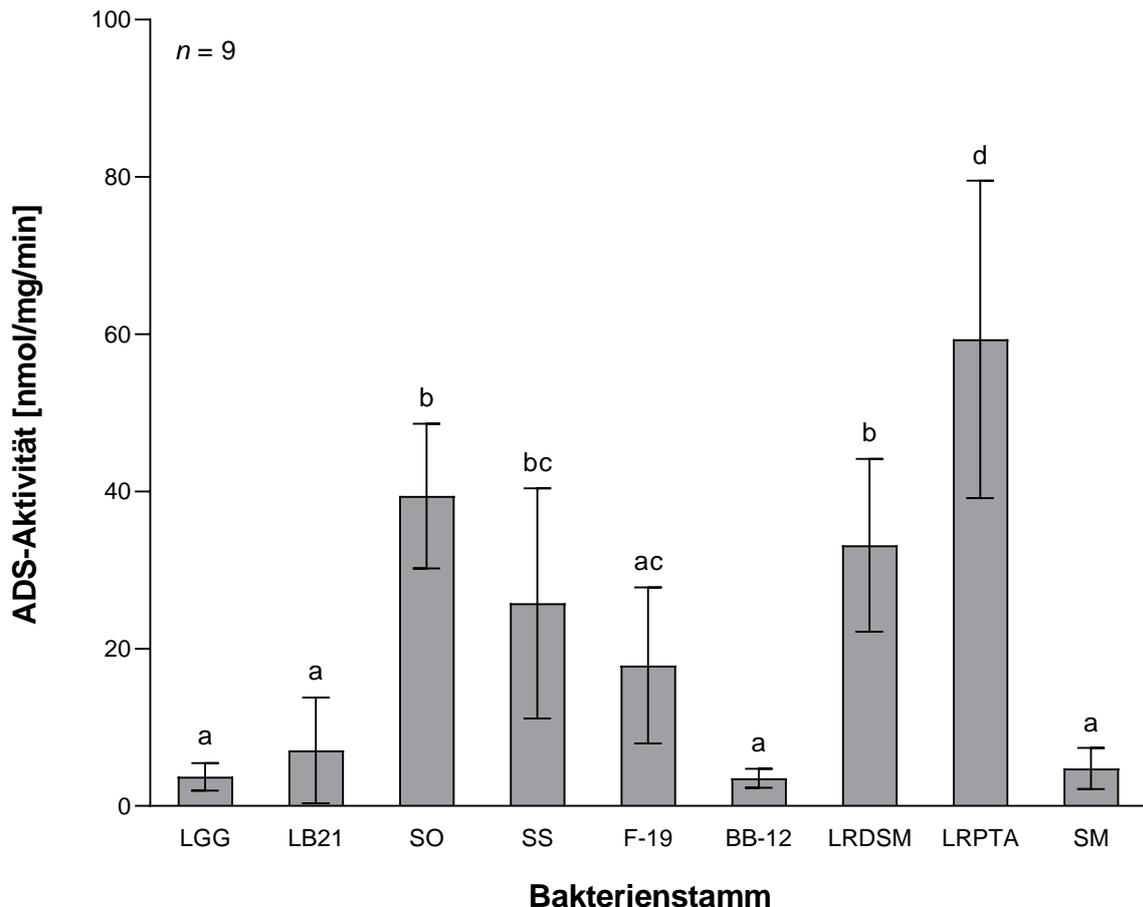


Abb. 13 Barcharts für die ADS-Aktivität [nmol/mg/min] der einzelnen Bakterienstämme. Angegeben sind Mittelwert (Balken) und Standardabweichung (Antennen). Gruppen, die mit den gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0.05$).

6.2. Auswertung des Zuckerfermentationstests

Das individuelle kariogene Potential wurde mittels eines Zuckerfermentationstests ermittelt. Hierfür wurde der Farbumschlag von Bromkresolpurpur 24, 48 und 72 Stunden nach Saccharosegabe untersucht (violett bei einem pH-Wert $> 6,8$, gelb bei einem pH $< 5,2$, dazwischen liegende Farben bei einen pH-Wert im Bereich zwischen 5,2 und 6,8). Für die statistische Auswertung wurden pH-Werten $> 6,8$ der Wert 0, pH-Werten zwischen 6,8 und 5,2 der Wert 1 und pH-Werten unterhalb von 5,2 der Wert 2 zugeordnet. Die pH-Werte nach Saccharosezufuhr unterschieden sich signifikant zwischen den Stämmen (Tab. 3). Daher wurde auch die zweite Nullhypothese verworfen. Bei sechs Probengruppen hatte sich der nach 24 Stunden eingestellte Farbumschlag während der restlichen Versuchsdauer nicht mehr geändert. Bei *F-19* kam es schon nach 24 Stunden zum Unterschreiten eines kritischen pH-Werts von 5,2, der sich über den gesamten Versuchszeitraum nicht mehr veränderte. Bei *SM* kam es ebenfalls zu einem

ausgeprägten pH-Wert-Abfall. Dieser war jedoch nicht so stark wie bei *F-19*. Bei den Stämmen *LA-5*, *SO*, *SS*, *BB-12* und *LRPTA* sank der pH-Wert über den gesamten Versuchszeitraum nicht unter 6,8. Bei *LGG* und *LB21* kam es bereits nach 24 Stunden zu einem moderaten pH-Wert-Abfall. Auffällig war, dass sich *LGG* nach 72 Stunden auch von *LB21* unterschied ($p < 0,001$), aber nicht mehr von *SM* und *F-19* ($p > 0,05$). Bei *LGG* erreichten nach 72 Stunden nahezu gleich viele Proben einen kritischen pH-Wert wie bei *SM*. Über den gesamten Zeitraum betrachtet unterschieden sich *LGG*, *LB21*, *LRDSM*, *F-19* und *SM* signifikant voneinander und auch von übrigen Gruppen.

Tab. 3 Ergebnisse des Fermentationstests nach 24, 48 und 72 Stunden und gemittelte Ergebnisse über den gesamten Zeitraum. Angegeben sind die Mittelwerte je Gruppe. Gruppen, die mit den gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich auf den gesamten Zeitraum bezogen nicht signifikant voneinander. Ein Wert von 0 = pH > 6,8; ein Wert von 2 = pH < 5,2; ein Wert von 1 = pH 5,2-6,8; Werte dazwischen bedeuten, dass innerhalb einer Gruppe verschiedene pH-Werte gemessen wurden.

Stamm	24h	48h	72h	Gesamter Zeitraum
LGG ^a	0,67	1,17	1,72	1,19
LB21 ^b	0,94	0,94	0,94	0,94
LA-5 ^c	0,00	0,00	0,00	0,00
SO ^c	0,00	0,00	0,00	0,00
SS ^c	0,00	0,00	0,00	0,00
F-19 ^d	2,00	2,00	2,00	2,00
BB-12 ^c	0,00	0,00	0,00	0,00
LRDSM ^e	0,00	0,39	0,44	0,28
LRPTA ^c	0,00	0,00	0,00	0,00
SM ^f	1,39	1,72	1,78	1,63

6.3. Auswertung der Adhäsion an S-HA

Um die Adhäsion der Bakterien an Hydroxylapatit zu quantifizieren, wurden die an S-HA-Discs adhärennten Bakterien angefärbt, der Farbstoff anschließend herausgelöst und in Lösung gebracht. Über die optische Dichte (OD_{550}) der jeweiligen Farblösungen konnte die Menge der adhärennten Bakterien ermittelt werden. Je höher die optische Dichte, desto mehr Bakterien hatten an die S-HA-Discs adhärennt. In der Kontrollgruppe war nach der Anfärbung mit Kristallviolett schon makroskopisch zu erkennen, dass es zu keiner nennenswerten Färbung der S-HA-Discs kam. Zwischen verschiedenen Versuchsgruppen waren nach der Anfärbung makroskopisch deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Violett-Färbung zu erkennen. Nach dem Herauslösen des Farbstoffs waren auch die entstandenen Lösungen bereits deutlich in ihren Färbungen voneinander zu unterscheiden.

Da es auch signifikante Unterschiede im Adhäsionsvermögen zwischen den Stämmen in Bezug auf das Adhäsionsvermögen gab (Abb. 14), wurde auch die dritte Nullhypothese verworfen. Das mit Abstand größte Adhäsionsvermögen hatte *SO* (Mittelwert (MW): 0,589 [OD_{550}]; Standardabweichung (SD): 0,087), gefolgt von *SS* (MW: 0,262; SD: 0,080), wobei die Unterschiede zwischen *SO* und *SS* signifikant waren. Allgemein hafteten die Bakterien aus der Gruppe der Streptokokken deutlich besser an S-HA als Laktobazillen und *BB-12*. *LGG* (MW: 0,156; SD: 0,040) und *F-19* (MW: 0,110; SD: 0,033) waren die einzigen Laktobazillen, die annähernd die Werte des schwächsten Streptokokken Stammes *SM* (MW: 0,162; SD: 0,055) erreichten. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen *F-19*, *LGG* und *SM*. Das schwächste Adhäsionsvermögen hatte *LRDSM* (MW: 0,031; SD: 0,016).

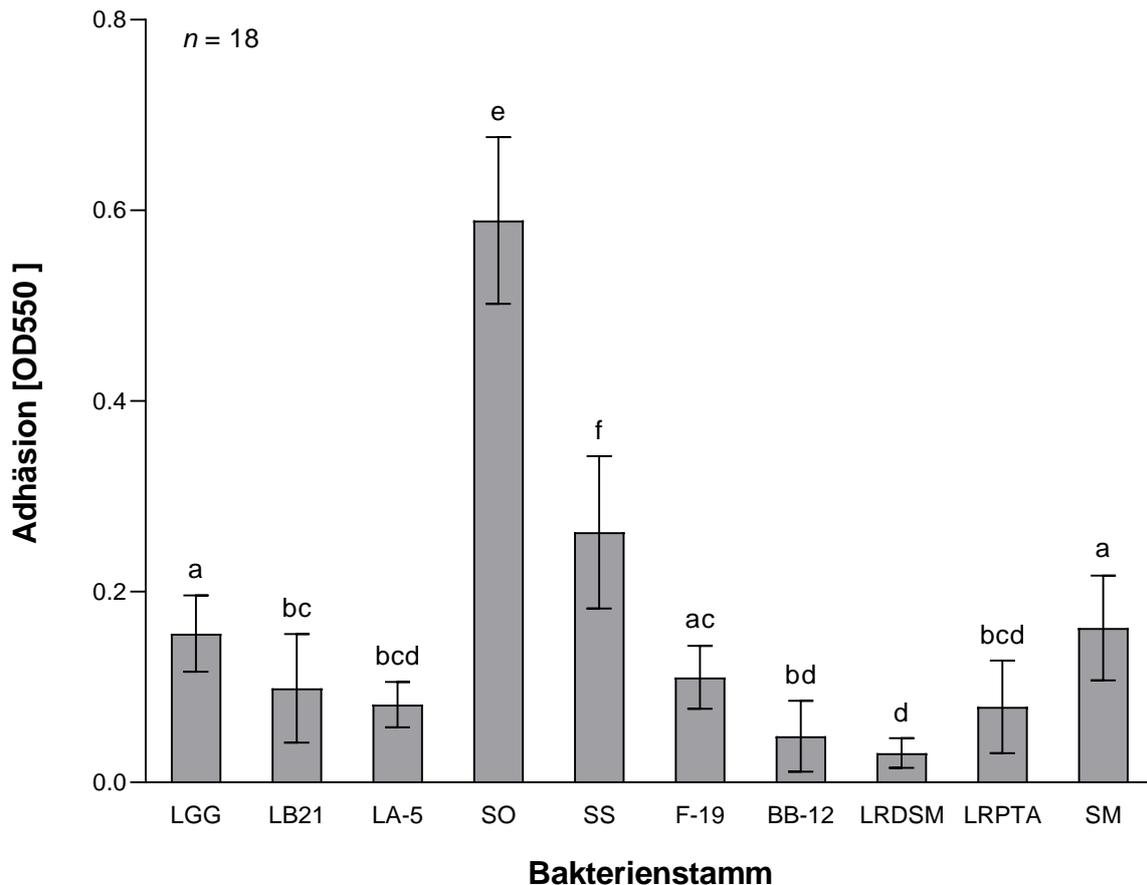


Abb. 14 Barcharts für das Adhäsionsvermögen an S-HA [OD₅₅₀] der einzelnen Bakterienstämme. Angegeben sind Mittelwert (Balken) und Standardabweichung (Antennen). Gruppen, die mit den gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0.05$).

6.4. Ergebnisübersicht

Versuchsübergreifend hatten *SO* und *LRPTA* die vielversprechendsten Ergebnisse für den Einsatz zur Kariesprävention bzw. -behandlung (Tab. 4). Beide zeigten eine signifikant höhere ADS-Aktivität als alle anderen Stämme und keine Anzeichen für eine relevante Säureproduktion nach Saccharosezufuhr. *SO* hatte außerdem von allen Stämmen die signifikant höchsten Adhäsionswerte. *LRPTA* hat ebenfalls bewiesen, dass er zur Adhäsion an S-HA befähigt ist (Adhäsion > 0).

Bakterienstämme der Gattung Streptokokken adhärten deutlich besser an Hydroxylapatit als Laktobazillen oder *BB-12*. Bei der ADS-Aktivität und bei der Zuckerfermentation fanden sich jedoch keine generellen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Bakteriengattungen.

Tab. 4 Heatmap zum Vergleich der Ergebnisse aller ermittelten Datenwerte. Für jede Gruppe ist der Mittelwert angegeben. ADS-Aktivität in nmol/min/mg; Adhäsion in OD₅₅₀; beim Fermentationstest gilt der Mittelwert für alle Ergebnisse im gesamten Zeitraum über 72 Stunden; ein Wert von 0 = pH > 6,8; ein Wert von 2 = pH < 5,2; ein Wert von 1 = pH 5,2 - 6,8; Werte dazwischen bedeuten, dass innerhalb einer Gruppe verschiedene pH-Werte gemessen wurden.

Stamm	ADS-Aktivität	Adhäsion	Fermentation
LGG	3,71	0,16	1,19
LB21	7,06	0,10	0,94
LA-5	Keine Werte	0,08	0,00
SO	39,42	0,59	0,00
SS	25,77	0,26	0,00
F-19	17,87	0,11	2,00
BB-12	3,53	0,05	0,00
LRDSM	33,16	0,03	0,28
LRPTA	59,36	0,08	0,00
SM	4,78	0,16	1,63

7. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich die neun probiotischen Stämme bezüglich ADS-Aktivität, Fermentations- und Adhäsionsvermögen deutlich voneinander unterscheiden. Alle Nullhypothesen haben sich nicht bestätigt. *SO* und *SS* sind Kandidaten, die in allen drei Versuchen Eigenschaften zeigten, die sie als Probiotika vielversprechend erscheinen lassen. Der Laktobazillen Stamm *LRPTA* zeigte die signifikant höchste ADS-Aktivität und keinerlei kariogenes Potential. Damit ist *LRPTA* ein weiterer vielversprechender Kandidat. Einige Stämme (*F-19*, *LB21*, *LGG*) hatten in einem Maß Säuren produziert, das zum Unterschreiten der kritischen pH-Schwelle führte. Deshalb muss ihr Einsatz als Probiotika zur Kariesprävention kritisch hinterfragt werden.

7.1. Diskussion der Ergebnisse

7.1.1. ADS-Aktivität

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Probiotika zu identifizieren, die eine hohe ADS-Aktivität haben. Kariesfreie Patienten haben sowohl in der Plaque als auch im Speichel eine deutlich erhöhte ADS-Aktivität im Vergleich zu Individuen mit Karies (Nascimento et al., 2009). Daher scheint eine Integration von Probiotika mit hoher ADS-Aktivität in die dentale Plaque vielversprechend zu sein, um die Kariesentstehung zu hemmen.

Bei der Berechnung der ADS-Aktivität konnten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen gefunden werden. Die höchste ADS-Aktivität zeigten die Streptokokken *SO* und *SS* und die Laktobazillen *LRPTA* und *LRDSM*. Die hohe ADS-Aktivität von *SS* ist wenig überraschend, da es einer der prominentesten Vertreter der bisher bekannten ADS-hochaktiven Stämme ist (Marquis et al., 1987; Wijeyeweera und Kleinberg, 1989; Burne und Marquis, 2000; Huang et al., 2015). Ebenfalls bekannt ist, dass sich auf der Oberfläche von *SO* das Enzym Arginin-Deiminase befindet (Xie et al., 2007; Nobbs et al., 2009), was die hohe ADS-Aktivität dieses Stammes in der vorliegenden Studie erklären könnte. Zwar ist bekannt, dass auch Laktobazillen befähigt sind, Arginin über das ADS zu verstoffwechseln (Burne und Marquis, 2000), dennoch sind die sehr hohen Werte der beiden *Lactobacillus reuteri* Stämme *LRDSM* und *LRPTA* überraschend. Das Potential, über das ADS den pH-Wert zu reduzieren, hat *LRPTA* in einer anderen Studie schon bewiesen (Jalasvuori et al., 2012). Dass *LRPTA* aber sogar eine signifikant höhere ADS-Aktivität im Vergleich zu *SO* und *SS* hatte, war nicht zu

erwarten. Damit scheint *LRPTA* ein vielversprechender Kandidat für die Kariesprävention zu sein.

Alle Stämme mit hohen ADS-Werten (*SO*, *SS*, *LRPTA*, *LRDSM*) zeigten in den Fermentationstests kein kariogenes Potential. Umgekehrt wiesen die nach dem Fermentationstest eher kariogenen Keime (*LGG*, *LB21*, *F-19*, *SM*) mit Ausnahme von *F-19* eine geringe ADS-Aktivität auf. Eine gesunde Plaque besteht aus nicht-kariogenen und nicht-azidurischen Bakterien (Marsh, 1994). Diese nur bedingt azidurischen Bakterien schützen sich vor einer Ansäuerung des umgebenden Gewebes durch die Produktion von Ammoniak, um den lokalen pH-Wert zu neutralisieren (Marquis et al., 1987; Casiano-Colon und Marquis, 1988; Curran et al., 1995; Liu et al., 2008). Kariogene Keime sind aufgrund anderer verschiedener Mechanismen azidurisch und benötigen daher kein ADS, um Säuren abzupuffern. Es ist daher schlüssig, dass in der vorliegenden Untersuchung Keime mit großer Fermentationsleistung (*LGG*, *LB21*, *SM*) keine hohe ADS-Aktivität hatten, da sie diese physiologisch betrachtet nicht zum Überleben brauchen. In einer klinischen Studie konnten in der Plaque von Patienten mit Wurzelkaries vermehrt *SM* und *Lactobacillus rhamnosus* nachgewiesen werden, während in der Plaque kariesfreier Patienten vermehrt u.a. *SO* und *SS* gefunden wurden (Becker et al., 2002; Preza et al., 2008). Die Erkenntnis, dass *SO* und *SS* häufiger in der Plaque kariesfreier Patienten vorkommen, kombiniert mit dem Fazit dieser Studie, dass sie über eine hohe ADS-Aktivität verfügen, ist eine mögliche Erklärung dafür, warum kariesfreie Patienten eine höhere Ammoniak-Konzentration und höher bleibende pH-Werte in deren Plaque haben (Margolis et al., 1988). Probiotische Stämme mit hoher ADS-Aktivität (*SO*, *SS*, *LRPTA*, *LRDSM*) könnten die Plaqueökologie auf synergetische Weise beeinflussen, d.h. den pH-Wert der Plaque vermindern und das Kariesrisiko damit senken.

7.1.2. Zuckerfermentation

Grundvoraussetzung für den Einsatz von Probiotika ist, dass eine mögliche Schädigung des Wirtes ausgeschlossen ist. Folglich dürfen Bakterien, die in den dentalen Biofilm integriert werden sollen, kein kariogenes Potential haben. Die in dieser Studie gewonnenen Daten zur Fermentation können folgendermaßen bewertet werden: Bakterien, die in vitro genügend Säuren produziert haben, um eine pH-Lösung < 6 zu erzeugen, sind potenziell kariogen, müssten aber zur Sicherstellung dieser These noch in weiteren In-vitro-Studien z.B. auf daraus resultierende Mineralverluste untersucht

werden. Im Umkehrschluss ist davon auszugehen, dass Bakterien, die im Fermentationstest nicht in der Lage waren, Säuren zu produzieren, auch klinisch wahrscheinlich kein relevantes kariogenes Potential aufweisen dürften. Um dies zu bestätigen, sollten jedoch weitere Studien unter Berücksichtigung des Verhaltens der potenziellen Probiotika in komplexeren Biofilmen und unter Einsatz anderer Zuckerarten erfolgen.

In der vorliegenden Studie haben einige Probiotika so wenig Säure produziert, dass der pH-Wert nie (*LA-5*, *SO*, *SS*, *BB-12*, *LRPTA*) oder bei nur wenigen Proben (*LRDSM*) unter einen Wert von 6,8 gesunken ist. Dass die beiden Streptokokken *SS* und *SO* nicht kariogen sind, wurde schon in anderen Studien gezeigt (Tong et al., 2007; Zhang et al., 2010) und auch für *LRPTA* belegen Studien anderer Autoren die hier gefundenen Ergebnisse (Nikawa et al., 2004; Hedberg et al., 2008; Jalasvuori et al., 2012). Zur Kariogenität von *BB-12* liegt eine heterogene Studienlage vor. In Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Studie führte Saccharose zu keinem wesentlichen pH-Wert-Abfall, Glukose dafür zu einem deutlich niedrigeren pH-Wert (Haukioja et al. 2008). Ein Versuch mit einem *BB-12* Monokultur-Biofilm und Saccharose im Nährmedium führte in einem künstlichen Mundmodell zu einem messbaren Mineralverlust boviner Zähne (Schwendicke et al. 2014). Auch wenn dieser deutlich geringer ausfiel als bei *SM*, zeigten die Ergebnisse, dass *BB-12* durchaus ein kariogenes Potential hat. Die Diskrepanz der Ergebnisse bei *BB-12* unterstreicht, welchen Vorteil die Messung des Mineralverlusts als Parameter zur Beurteilung der Kariogenität bei experimentellen Untersuchungen hat. Die in den Experimenten der vorliegenden Studie identifizierten vielversprechenden und im Fermentationstest nicht kariogenen Probiotika (*SS*, *SO*, *LRPTA*) sollten daher in einem Versuchsaufbau mit einem künstlichen Mundmodell auf die mögliche Erzeugung von Mineralverlusten an Zahnproben untersucht werden.

Dass die meisten Proben von *SM* schon nach 24 Stunden den kritischen pH-Wert von 5,2 unterschritten hatten, bestätigt, was bekannt ist: *SM* ist ein hoch kariogener Keim (Tanzer et al., 2001). Der noch stärker ausgeprägte pH-Wert-Abfall bei *F-19* war überraschend – nur eine weitere Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen (Haukioja et al., 2008). In einer anderen Studie, in der ein ähnlicher Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde, fand keine nennenswerte Verstoffwechselung von Zucker durch *F-19* statt (Hedberg et al., 2008). Einen Ansatz zur Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Tatsache sein, dass in vorliegender Studie etwas mehr Zucker

verwendet wurde, da auch im Kultivierungsmedium Glukose enthalten war. Weitere Untersuchungen sind nötig, um das kariogene Potential von *F-19* besser abschätzen zu können.

Die vorliegenden Ergebnisse für die beiden *Lactobacillus rhamnosus* Stämme *LGG* und *LB21* bestätigen die sich mittlerweile häufende Evidenz, dass *Lactobacillus rhamnosus* ein kariogenes Bakterium ist. Zwar hat keiner der beiden Stämme nach 24 oder 48 Stunden den kritischen pH-Wert von 5,2 unterschritten, aber bei beiden Stämmen wurden vergleichsweise niedrige pH-Werte zwischen 5,2 – 6,8 erreicht. Nur *LGG* unterschritt nach 72 Stunden auch den kritischen pH-Wert. *LGG* scheint ein größeres kariogenes Potential zu haben als *LB21*, da er über den gesamten Zeitraum signifikant mehr Säuren produziert hat als *LB21*. Untersuchungen anderer Autoren resultierten in analogen Ergebnissen (Hedberg et al., 2008). Auch Versuche mit Biofilmen auf Echtzähnen kamen zu ähnlichen Erkenntnissen: während *LGG* zu Mineralverlusten führte (Schwendicke et al., 2014), konnten bei *LB21* keine signifikanten Verluste gemessen werden (Fernández et al., 2015). Beachtlich ist diese Erkenntnis vor dem Hintergrund, dass *LGG* eines der populärsten Probiotika ist und schon Teil klinischer Studien war (Nase et al., 2001; Ahola et al., 2002).

Erwähnenswert ist aber in diesem Zusammenhang auch, dass Laktobazillen vorwiegend mit kariösem Dentin und fortschreitenden Kariesläsionen in Verbindung gebracht werden und nicht mit der frühzeitigen Demineralisation von Schmelz (Edwardsson, 1974; Becker et al., 2002). So wurde klinisch gezeigt, dass bei Kindern im Alter von ein bis sechs Jahren nach siebenmonatiger Einnahme von *LGG* das Kariesrisiko signifikant gesunken war (Nase et al., 2001). Einen möglichen Grund hierfür könnte das Ergebnis einer Studie von Lee und Kim liefern, die zeigte, dass *LGG*, durch einen effektiven Substratzug die Produktion extrazellulärer Polysaccharide von SM signifikant reduzieren konnte (Lee und Kim, 2014). Auch wenn es so scheint, als seien Kinder im Alter des Zahndurchbruchs, bei der klinischen Applikation von *LGG* keinem Kariesrisiko ausgesetzt, widerlegen die Ergebnisse vorliegender Studie diese Annahme. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Untersuchung Stämme identifiziert worden sind, die vielversprechende, vor Karies schützende Eigenschaften bei geringerer Kariogenität haben, lässt den Nutzen einer probiotischen Therapie mit potenziell kariogenen Keimen anzweifeln. Deshalb sollten in zukünftigen klinischen Studien auch andere, möglicherweise vielversprechendere Keime untersucht werden.

7.1.3. Adhäsion an S-HA

Die Anhaftung von Bakterien an Oberflächen ist einer der ersten Schritte, die zur Biofilmbildung führen (Costerton et al., 1987). Daher ist die Fähigkeit der Adhäsion eine für Probiotika relevante Eigenschaft. Die Verweildauer in der Mundhöhle nach der Einnahme ist jedoch kürzer als in anderen Bereichen des Verdauungstrakts (vgl. erfolgreicher Einsatz von Probiotika zur Behandlung gastrointestinaler Erkrankungen), denn die oralen Bakterien werden gemeinsam mit dem Speichel relativ schnell in den Magen abtransportiert (Kolenbrander et al., 2002). Orale Probiotika müssen daher das Potential haben, schnell und effektiv an Oberflächen der Mundhöhle haften zu können. Daher wird angenommen, dass nur Bakterien, die gute Bindungseigenschaften haben, auch in der Lage sind die Mundhöhle zu kolonisieren.

Die höchsten Adhäsionswerte wurden in dieser Studie bei den Streptokokken (*SO*, *SS*, *SM*) gemessen. Streptokokken besitzen bekanntermaßen ein höheres Adhäsionspotential als Laktobazillen (Busscher et al., 1999; Nobbs et al., 2009). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse anderer Studien: *SS* und *SO* haben ein hohes Adhäsionspotential, v.a. auch im Vergleich zu *SM* (van Houte et al., 1970; Zhang et al., 2010). *SS* ist einer der bekanntesten Erstbesiedler bei der Biofilmbildung (Nyvad und Kilian, 1987). Die hohen Adhäsionswerte von *SS* sind daher logisch: Erstbesiedler müssen physiologisch betrachtet über ein hohes Adhäsionsvermögen verfügen. Nach der Adhäsion der Erstbesiedler nimmt im Laufe der Biofilmbildung die Bakterienvielfalt stark zu. Entscheidend für die individuelle Zusammensetzung des Biofilms ist die Ernährung. Besteht die Nahrung zu großen Anteilen aus niedermolekularen Kohlehydraten, nimmt der Anteil von *SM* im Biofilm zu, während der Anteil von *SS* abnimmt (Staat et al., 1975; Minah et al., 1985; Dennis et al., 1975). Grund hierfür ist die fehlende Säuretoleranz von *SS* gegenüber den von kariogenen Keimen (wie *SM*) produzierten Säuren (Horiuchi et al., 2009).

Es besteht eine Korrelation zwischen einer frühen Besiedlung der Mundhöhle mit *SS* und einer verzögerten Kolonisation von *SM*. Kinder, die keine nachweisbaren Mengen an *SM* aufweisen, haben in ihrem Speichel signifikant höhere Konzentrationen von *SS* im Vergleich zu Kindern, deren Mundhöhle mit *SM* kolonisiert ist (Caufield et al., 2000). Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass die frühzeitige Besiedlung von *SS* die nachfolgende Besiedlung von *SM* beeinflussen kann. Da *SS* aber bekanntermaßen ein nicht säuretoleranter Bakterienstamm ist (Horiuchi et al., 2009),

scheint die Anwendung als Probiotikum wenn überhaupt eher für die Vorbeugung von Karies sinnvoll zu sein.

Dass *SO* und *SS* in allen Versuchen ähnliche Ergebnisse zeigten, lässt sich damit erklären, dass sie innerhalb der Streptokokken-Untergruppen beide zur Mitis-Gruppe gehören. *SO* wurde ebenfalls vermehrt in der Plaque kariesfreier Patienten gefunden (Becker et al., 2002; Tong et al., 2003; Preza et al., 2008). Die fast doppelt so hohen Adhäsionswerte von *SO* sind vielversprechend im Hinblick darauf, dass eine Anhaftung an der Zahnoberfläche unter klinischen Bedingungen Erfolg haben könnte. Ätiologisch betrachtet gehört nicht nur *SS*, sondern viele Streptokokken der Mitis-Gruppe zu Erstbesiedlern der Mundhöhle. Die Anlagerung von Erstbesiedlern ermöglicht es *SM* erst, in großen Mengen an der Zahnhartsubstanz zu binden. Deshalb gilt es bei ersten klinischen Probiotikastudien mit *SS* und *SO* kritisch zu prüfen, ob der gewünschte Effekt einer Vermehrung von *SS* und *SO* auftritt oder ob die gute Adhärenz dieser Keime nur Wegbereiter für eine nachfolgende ausgeprägtere Kolonisation mit *SM* ist.

In der vorliegenden Studie hatten alle Laktobazillen und *BB-12* schlechtere Adhäsionswerte als die Streptokokken. Aus kariesätiologischer Sicht überrascht das nicht, denn Laktobazillen sind keine Erstbesiedler, sondern spielen erst im späteren Prozess der Biofilmbildung eine Rolle, wenn eine Adhäsion an die Zahnhartsubstanz schon durch andere Keime erfolgt ist (Marsh, 1994). Trotzdem muss betont werden, dass in der vorliegenden Studie alle Laktobazillen gezeigt haben, dass sie zur Adhäsion an S-HA befähigt sind (Adhäsion > 0). *LGG* und *F-19* unterschieden sich dabei nicht signifikant von *SM*. Stamatova et al. hatten sogar eine signifikant höhere Adhäsion von *LGG* im Vergleich zu *SM* gemessen (Stamatova et al., 2009). Andere Autoren kamen in ähnlichen In-vitro-Experimenten zu dem Resultat, dass *LA-5* (Busscher et al., 1999), die meisten *Lactobacillus rhamnosus* Stämme einschließlich *LGG* (Stamatova et al., 2009; Haukioja et al. 2006; Haukioja et al., 2008) sowie *LRPTA* (Jalasvuori et al., 2012) vergleichsweise hohe Adhäsionswerte haben. Eine relativ niedrige Adhäsion haben demnach *BB-12* (Haukioja et al. 2006; Haukioja et al. 2008), *F-19* (Haukioja et al., 2006) und *Lactobacillus reuteri 55730* (Mutterstamm von *LRDSM*) (Haukioja et al., 2006; Jalasvuori et al., 2012). Größtenteils stimmt dies mit den vorliegenden Beobachtungen überein mit Ausnahme von *F-19*, welcher in der vorliegenden Untersuchung zu den besser adhärierenden Laktobazillen gehörte. Außer *LRDSM* adhärten alle Laktobazillen-Stämme besser als *BB-12*. Im Allgemeinen ist die In-vitro-Haftung der Bifidobakterien an Wirtsoberflächen im Vergleich zu der Adhäsion von Laktobazillen

gering (Apostolou et al., 2001; He et al., 2001). Insgesamt stellt sich heraus, dass vorliegende Ergebnisse mit der Datenlage aktueller Literatur übereinstimmen.

Die Ergebnisse bestätigen, dass Probiotika in vitro an S-HA adhären können. Andere In-vitro-Studien konnten zeigen, dass das Wachstum in einem Ökosystem mit anderen Biofilmspezies ebenfalls möglich ist (Comelli et al., 2002; Pham et al., 2011). Dennoch legen klinische Studien nahe, dass sich die Kolonisation von Probiotika in der Mundhöhle unter Praxisbedingungen bedeutend schwieriger zu sein scheint. *BB-12*, *F-19* und *LA-5* (Ravn et al., 2012), *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus casei* (Busscher et al., 1999) sowie *LGG* (Yli-Knuutila et al., 2006) konnten in klinischen Studien nicht dauerhaft in die dentale Plaque integriert werden. Ein Grund für die Diskrepanz zwischen Ergebnissen aus In-vitro- und In-vivo-Studien könnte sein, dass probiotische Bakterien nicht-oraler Herkunft über eine geringere Anzahl an Rezeptoren in der dentalen Plaque verfügen (Comelli et al., 2002). Die meisten Laktobazillen sind azidogen und vermehren sich im Rahmen der Biofilmbildung erst dann, wenn der lokale pH-Wert fällt (Horiuchi et al., 2009). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Besiedlung und das Wachstum von azidogenen Bakterien in der Mundhöhle nur durch wiederholte Exposition von Zuckern und der daraus resultierenden Säuerung der Umwelt ermöglicht werden kann (Bradshaw et al., 1989). Eine dauerhafte Integration von probiotischen Laktobazillen oder Bifidobakterien in den dentalen Biofilm kann daher wahrscheinlich nur schwer realisiert werden. Dennoch scheint die vorübergehende Kolonisation für den Zeitraum der Einnahme des probiotischen Produkts möglich (Montalto et al., 2004; Krasse et al., 2006; Yli-Knuutila et al., 2006). Krasse et al. konnten zeigen, dass nach 14-tägiger Einnahme von *Lactobacillus reuteri LR-1* oder *LR-2* 65 % der Patienten mit *LR-1* kolonisiert waren und 95 % mit *LR-2* (Krasse et al., 2006). Die Ergebnisse von Çaglar et al. wiederum zeigten, dass es nach einwöchiger Einnahme bei lediglich 8 % der Probanden zu einer Kolonisation mit *Lactobacillus reuteri ATCC 55730* (Mutterstamm von *LRDSM*) kam (Çaglar et al., 2009). Die widersprüchlichen Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer klinischer Untersuchungen. Die Tatsache, dass *LRPTA* höhere Adhäsionswerte aufweist als *LRDSM*, lässt hoffen, dass damit eine vorübergehende Besiedlung möglich ist.

Die am häufigsten verwendeten Stämme in der probiotischen Forschung gehören zu den Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* (Ouwehand et al., 2002). Streptokokken wurde bisher kaum Aufmerksamkeit geschenkt. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen auf, dass die Streptokokken *SO* und *SS* aufgrund ihres hohen Adhäsionsvermögens

besser geeignet sein könnten die Mundhöhle zu kolonisieren als Laktobazillen. In weiteren In-vitro-Untersuchungen sollte daher gerade bei diesen Keimen deren Kolonisationsfähigkeit in einem Multispeziesbiofilm untersucht werden. Dabei sollte insbesondere das individuelle Vermögen, kariogene Keime aus einem bestehenden Biofilm zu verdrängen bzw. deren Wachstum zu hemmen, untersucht werden.

7.1.4. Versuchsübergreifend

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, ein Probiotikum zu finden, welches in allen drei Untersuchungen kariesprotektive Eigenschaften zeigte. Dies war der Fall bei *SO*, *SS* und mit Ausnahme des geringeren Adhäsionsvermögens auch bei *LRPTA*. Die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften von Streptokokken und Laktobazillen könnten zu unterschiedlichen Anwendungsindikationen führen.

Wenn das Ziel des probiotischen Einsatzes eine Kariesprävention sein soll, wäre es denkbar, dass die Einnahme nach der häuslichen mechanischen Zahnreinigung erfolgt, damit die konsumierten Probiotika Teil der anschließend einsetzenden physiologischen Biofilmbildung sind. Da zumindest in der Theorie mit der mechanischen Reinigung der Biofilm auf den Zähnen größtenteils entfernt wird, ist eine Adhäsion der eingenommenen Probiotika an die pellicelbeschichtete Zahnoberfläche essentiell. Bisher gibt es keine Evidenz dafür, dass eine dauerhafte Integration von Probiotika in die Mundhöhle möglich ist (Ravn et al., 2012). Bisher waren hauptsächlich Laktobazillen im Fokus der probiotischen Forschung. Es gibt kaum klinische Studien, die probiotische Streptokokken auf ihre Kolonisationsfähigkeit untersuchen. Unter Umständen wären eingenommene Streptokokken aufgrund ihres hohen Adhäsionsvermögens in der Lage, sich dauerhaft in die Mundhöhle zu integrieren. Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Studie, würden dafür die beiden Streptokokken *SO* und *SS* in Frage kommen. Devine und Marsh stellten die Hypothese auf, dass es einfacher sein könnte, die Bakterienflora zum Zeitpunkt der Erstbesiedlung zu modifizieren als später im Leben, wenn die Mundflora bereits fest etabliert ist (Devine und Marsh, 2009). Diese Hypothese und das Wissen, dass Kinder deren Mundhöhle frühzeitig mit *SS* kolonisiert worden ist, eine verzögerte Kolonisation von *SM* aufweisen (Caufield et al., 2000), lässt die Vermutung zu, dass eine frühzeitige probiotische Intervention im Säuglingsalter mit Streptokokken wie *SS* und *SO* in späteren Lebensjahren eine weniger kariogene Mundflora zur Folge haben könnte. Insbesondere *SO* scheint hierfür ein vielversprechender probiotischer Kandidat zu sein (Bao et al., 2015). Jüngste Studien zu diesem Bakterium zeigten neben einer hohen ADS-

Aktivität (Xie et al., 2007; Nobbs et al., 2009) weitere kariesprotektive Eigenschaften, die eine Integration von möglichst vielen *SO* Bakterien in den dentalen Biofilm als erstrebenswert erscheinen lassen. Die vorliegende Untersuchung bestätigt Ergebnisse anderer Autoren, nach denen *SO* nicht kariogen ist. *SO* wurde aus der Plaque kariesfreier Individuen isoliert (Becker et al., 2002; Tong et al., 2003; Preza et al., 2008) und produziert deutlich weniger Säure als *SM* (Zhang et al., 2010). In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass *SO* das Wachstum von *SM* in einem Multispeziesbiofilm inhibieren kann (Tong et al., 2007; Zhang et al., 2010; Liu et al., 2012). Tong et al. konnten demonstrieren, dass *SO* das Wachstum von *SM* durch die Produktion von H_2O_2 einschränkt, und zwar sowohl in einer Suspension als auch in einem Multispeziesbiofilm (Tong et al., 2007). *SO* kann zudem mittels der beiden Enzyme Laktatoxidase und Pyruvatoxidase aus Laktat und Pyruvat H_2O_2 produzieren (Liu et al., 2012). Die H_2O_2 -Produktion hat also zwei kariesprotektive Wirkmechanismen: Minimierung des pH-Abfalls durch die Verstoffwechslung von Laktat und Pyruvat und Hemmung von *SM* durch H_2O_2 (Tong et al., 2007). In diesem Zusammenhang interessant sind die Ergebnisse von Bao et al., die zeigen konnten, dass *SO* auch bei längeren Episoden mit niedrigem pH-Wert effektiv in der Lage war, das Wachstum von *SM* zu reduzieren (Bao et al., 2015). Obwohl auch *SS* in der Lage ist das Wachstum von *SM* durch die Produktion von H_2O_2 zu behindern (Kreth et al., 2005) und ebenfalls in vorliegender Untersuchung hohe ADS-Werte erreichte, ist er vermutlich nicht als Probiotikum geeignet. Die In-vitro-Ergebnisse, in denen *SS* das Wachstum von *SM* behindert hatte, wurden meist bei neutralem pH-Wert erreicht. *SS* ist aber kein säuretolerantes Bakterium (Horiuchi et al., 2009); Bei Multispeziesbiofilmen mit *SM* stirbt *SS* bei niedrigen pH-Werten (Bradshaw und Marsh, 1998; Bradshaw et al., 2002). *SO* hat in der vorliegenden Studie bessere Adhäsions- und ADS-Werte als *SS* erzielt, kann auch unter niedrigen pH-Bedingungen überleben und zugleich das Wachstum von *SM* reduzieren. Dies macht es zu einem sehr vielversprechenden probiotischen Kandidaten.

Ist der Einsatz von Probiotika zum Zweck einer therapeutischen Intervention gedacht, also zum Verhindern der Progression einer bereits bestehenden Kariesläsion, wäre das Ziel dieser Intervention die Integration der Probiotika in einen etablierten Biofilm. Eine Adhäsion an die Pellikel wäre damit keine relevante Voraussetzung mehr für die Wirksamkeit. Da sich Laktobazillen auch im Rahmen der physiologischen Biofilmbildung in großen Mengen in bereits bestehende Biofilme integrieren (Marsh, 1994), besteht die

Annahme, dass dies zumindest für die Dauer der probiotischen Therapie auch mit nicht-pathogenen Laktobazillen möglich ist. Vielversprechendster probiotischer Kandidat unter den Laktobazillen war in dieser Studie *LRPTA*. Jalasvuori et al. schlussfolgerten in einer ähnlichen Studie ebenfalls, dass *LRPTA* geeigneter ist als *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 (Mutterstamm von *LRDSM*). *LRPTA* hatte hier ebenfalls eine höhere ADS-Aktivität und ein höheres Adhäsionsvermögen (Jalasvuori et al., 2012). Die beiden mit *LRPTA* verwandten *Lactobacillus reuteri* Stämme *LR-1* und *LR-2* konnten klinisch bereits zeigen, dass eine vorübergehende Integration in den Biofilm für die Dauer der Probiotikaeinnahme möglich ist (Krasse et al., 2006). *LRPTA* hatte in der vorliegenden Untersuchung die höchste ADS-Aktivität. Eine Integration dieses Stammes bei kariesaktiven Patienten wäre erstrebenswert und vielversprechend, da Patienten mit gesunder Plaque eine deutlich höhere ADS-Aktivität zeigen als Patienten mit kariogener Plaque (Nascimento et al., 2013). Verschiedene *Lactobacillus reuteri* Stämme haben in diversen Studien ihr antimikrobielles Potential unter Beweis gestellt. Durch deren Einnahme konnte zum Beispiel die Anzahl von *SM* im Speichel signifikant reduziert werden (Çaglar et al., 2006; Çaglar et al., 2007; Çaglar et al., 2008; Nikawa et al., 2004). *LRPTA* und *LRDSM* konnten nach einer „full-mouth“ Desinfektion mit CHX die mengenmäßige Rückkehr von *SM* in die Mundhöhle deutlich verzögern (Romani Vestman et al., 2013). Dass auch mit Laktobazillen eine Intervention im Säuglingsalter Erfolg haben könnte, zeigte eine Studie von Stensson et al. Die Versuchsgruppe (schwängere Mütter (vier Wochen vor geplantem Geburtstermin) und deren neugeborenen Säuglinge (ab Geburt ein Jahr lang)), konsumierten Lutschtabletten, die *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 enthielten. Kinder der Versuchsgruppe hatten im Alter von neun Jahren eine signifikant geringere Kariesprävalenz und signifikant geringere Zahnfleischblutungen als die Kinder der Placebogruppe. Dass es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen bezüglich der Plaquemenge gab und trotzdem Unterschiede in der Kariesprävalenz, lässt darauf schließen, dass bei Kindern der Versuchsgruppe eine Veränderung der Plaqueflora in Richtung einer weniger kariogenen Plaque führte (Stensson et al., 2013).

Probiotika im Allgemeinen (Gruner et al., 2016) und insbesondere *Lactobacillus reuteri* (Teughels et al., 2013; Szkaradkiewicz et al., 2014; Flichy-Fernández et al., 2015; Tekce et al., 2015) haben ebenfalls ein großes Potential zur Prophylaxe und Therapie parodontaler Erkrankungen. Ihr Einsatz könnte also nicht nur zur Kariesprävention und -behandlung sondern auch für die Parodontitisprophylaxe und -therapie wertvoll sein.

7.2. Diskussion der Methodik und Limitationen

Generell besteht die Problematik, dass In-vitro-Modelle nur eine begrenzte Aussagekraft für die klinische Situation haben. Daher eignen sich die generierten Ergebnisse nicht dazu, konkrete Handlungsempfehlungen für den klinischen Einsatz der Probiotika zu geben. Die durchgeführten Untersuchungen sollten Hinweise zu Eigenschaften bei verschiedenen Probiotika liefern, die möglicherweise relevant für deren Einsatz bei der Vorbeugung und Therapie von Karies sind. Hierdurch sollten Bakterienstämme mit vielversprechenden Eigenschaften identifiziert werden, die in weiteren In-vitro- und später möglicherweise auch in klinischen Studien untersucht werden können.

7.2.1. Nährmedien

Ziel der Studie war es, Streptokokken, Laktobazillen und das Bifidobakterium *BB-12* miteinander zu vergleichen. Dafür waren möglichst gleiche Versuchsbedingungen für alle Stämme notwendig. Eine Kultivierung mit den gleichen Nährmedien war aber aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an die Kultivierungsbedingungen nicht möglich. Laktobazillen und auch *BB-12* benötigen mehr Nährstoffe als die meisten Streptokokken und benötigen für vergleichbare Wachstumsraten wie Streptokokken mehr Zucker. Das MRS-Medium wurde speziell für die Bedürfnisse von Laktobazillen entwickelt. Es bietet einen hohen Nährstoffgehalt (Glukosegehalt 20 g/l), beinhaltet spezielle für Laktobazillen als Wachstumsfaktoren bekannte Substanzen (Polysorbat, Acetat, Magnesium und Mangan) und außerdem einen von Laktobazillen bevorzugten pH-Wert von $6,2 \pm 0,2$ (De Man et al., 1960). Streptokokken zeigen bei anderen pH-Werten (vgl. BHI: $\text{pH} = 7,4 \pm 0,2$) ein besseres Wachstum (Beal et al., 1989). Eine Kultivierung im selben Nährmedium wäre zwar möglich gewesen, hätte aber einige der Bakterienarten im Wachstum selektiv gefördert oder gehemmt. Ziel der Kultivierung war, für jedes Bakterium bestmögliche Wachstumsbedingungen zu schaffen.

Experimentspezifisch wurde versucht, die Einflusskomponenten unterschiedlicher Kultivierungsmedien zu exkludieren. Bei der Messung der ADS-Aktivität hat die Inkubation mit Arginin, welches zu L-Citrullin verstoffwechselt wurde, in einem speziellen Medium (2YT-Medium) stattgefunden, in dem alle Bakterienarten gleichermaßen heranwachsen konnten und zu Stoffwechselleistungen fähig waren. Um gleiche Bedingungen bei der Untersuchung auf das Fermentationsverhalten zu erhalten, wurde ein modifiziertes MRS-Medium hergestellt mit demselben Glukosegehalt (2 g/l) wie das konventionelle BHI-Medium. Die Bakterieninkubation beim Adhäsionstest mit den S-HA-

Discs erfolgt nicht mehr in einem Kultivierungsmedium, sondern in PBS. PBS war ein geeignetes neutrales Medium, da unter den gegebenen Bedingungen zwar kein weiteres Wachstum stattfand, die Bakterien aber am Leben gehalten wurden und weiterhin zu Stoffwechsellleistungen befähigt waren.

7.2.2. Messung der ADS-Aktivität

Der Versuchsaufbau war an die Methode der ADS-Aktivitätsbestimmung aus einer Untersuchung von Huang et al. angelehnt (Huang et al., 2015). In dieser Studie wurde die ADS-Aktivität verschiedener Streptokokken-Stämme bei unterschiedlichen Bedingungen gemessen. Für die Fragestellung der vorliegenden Analyse sollte auch die ADS-Aktivität von Laktobazillen und dem Bifidobakterium *BB-12* ermittelt werden. In Vorversuchen konnte dargelegt werden, dass im modifizierten 2YT-Medium (10 Mm Arginin, 25 Mm Galaktose) neben Streptokokken auch Laktobazillen und *BB-12* adäquat wachsen konnten. Der pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt und spiegelte den physiologischen pH-Wert der Mundhöhle wider. Es musste jedoch davon ausgegangen werden, dass für die verschiedenen Stämme unterschiedliche Wachstumsbedingungen herrschen. Deshalb wurden die Kultivierungszeiten für jeden Stamm entsprechend angepasst. Die individuell benötigte Zeit bis eine OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 erreicht wurde, war ein späterer Faktor in der Berechnung der ADS-Aktivität. Damit wurden Stämme, die langsam wuchsen, in vorliegendem Versuchsdesign nicht wesentlich benachteiligt. Durch die Bestimmung des Proteingehalts konnte die gemessene Menge an L-Citrullin auf den Gesamtproteingehalt der L-Citrullin-produzierenden Bakterien bezogen werden. So wurde versucht, eine Verfälschung durch unterschiedliche Mengen an L-Citrullin-produzierenden Bakterienzellen auszuschließen. Diese Methodik war schon Bestandteil anderer In-vitro-Studien (Archibald, 1944; Liu et al., 2008; Huang et al., 2015).

Die Umgebungsbedingungen haben einen großen Einfluss auf die ADS-Aktivität der Bakterien. Andere Studien haben gezeigt, dass die Anwesenheit von Zucker die ADS-Aktivität unterdrückt und dass ein niedriger pH-Wert sowie anaerobe Bedingungen eine optimale ADS-Genexpression gewährleisten (Dong et al., 2004; Liu et al., 2008; Liu und Burne, 2009). Huang et al. haben diese Beobachtungen im Wesentlichen bestätigen können (Huang et al., 2015). Dennoch gab es in deren Untersuchung einzelne Bakterienstämme, deren ADS-Aktivität nicht bei niedrigem pH-Wert (5,7), sondern bei neutralem pH-Wert (7,0) höher waren. Bei anderen hatte der pH-Wert keinen Einfluss auf

die ADS-Aktivität. Da für die meisten in der Studie inkludierten Probiotika keine entsprechenden Werte in der Literatur vorliegen, ist nicht bekannt, bei welchem pH-Wert das individuelle Maximum ihrer ADS-Aktivität liegt. Es ist davon auszugehen, dass der neutrale pH-Wert beim Großteil der Bakterienstämme im Vergleich zu saureren Bedingungen zu einer geringeren ADS-Aktivität geführt hat. Zugleich ist aber nicht auszuschließen, dass einzelne Stämme die neutralen Bedingungen bevorzugt haben. Es wäre sinnvoll, in weiteren Studien die ADS-Aktivität der verschiedenen Stämme bei unterschiedlichen pH-Wert-Bedingungen zu untersuchen.

Obwohl die Inkubation der Bakterien in einem luftdicht verschlossenen Röhrchen erfolgte, herrschten aufgrund der vorhandenen Restluft mikroaerobe Umweltbedingungen. Bei Anwesenheit von Sauerstoff ist die ADS-Aktivität von Bakterien reduziert (Burne et al., 1991; Huang et al., 2015). Die gleichmäßige Reduktion der absoluten ADS-Werte über alle Stämme hinweg wurde aber akzeptiert, da der Fokus dieser Untersuchung auf dem relativen Vergleich der verschiedenen Stämme lag.

Die Anwesenheit von Arginin und Zucker beeinflusst die ADS-Aktivität von Bakterien. Während Arginin eine stimulierende Wirkung hat, wirkt die Anwesenheit von Zucker hemmend (Huang et al., 2015). Kohlenhydrate im Medium waren für den Versuch jedoch essentiell, um ein ausreichendes Wachstum der Bakterien zu gewährleisten. Daher musste zur Messung der ADS-Aktivität die optimale Menge an Zuckerzusatz ermittelt werden. Einerseits musste ein adäquates Wachstum gewährleistet sein und andererseits darf die ADS-Aktivität nicht zu sehr gehemmt werden. Die Ergebnisse einer anderen Studie verdeutlichen dieses Dilemma. Durch Zugabe von Glukose bis zu einer Konzentration von 0,25 % verbesserte sich das Wachstum der Bakterien, die höchste ADS-Aktivität gab es aber bei Konzentrationen von 0,05 %. Die Zugabe von 0,5 % Glukose unterdrückte die Ammoniak-Produktion gänzlich. Damit wurde die ADS-Aktivität im Wesentlichen gestoppt (Ferro et al., 1983). Neben der Konzentration spielt auch die Zuckerart eine Rolle. Galaktose stellte sich als besser geeignet heraus (Liu et al., 2008). Autoren berichten von fünf Mal höheren ADS-Aktivitäten mit Galaktose gegenüber Glukose (Huang et al., 2015). Basierend auf den Daten dieser Studie wurde in der vorliegenden Untersuchung eine Konzentration von 25 mM Galaktose benutzt.

Insgesamt konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht alle Faktoren berücksichtigt werden, die bei der Verstoffwechslung von Arginin in Biofilmen unter natürlichen Bedingungen eine Rolle spielen. Dass sich die Ergebnisse der ADS-Aktivitäten zwischen In-vitro-Studien an Einzelkulturen und den Plaqueproben

kariesaktiver Patienten zum Teil sehr stark unterscheiden, zeigt, dass In-vitro-Studien nicht vollständig simulieren können, wie die ADS-Aktivität in einem Biofilm reguliert wird (Burne und Marquis, 2000). Diese Tatsache muss als Limitation der vorliegenden Untersuchung akzeptiert werden.

7.2.3. Zuckerfermentationstest

Der durchgeführte Versuch war eine Modifikation eines Versuchsaufbaus von Hedberg et al., der mehrere Laktobazillen auf ihre Fähigkeit untersuchte, verschiedene Zucker und Zuckeralkohole zu verstoffwechseln (Hedberg et al., 2008). Da sich die drei wichtigsten am Kariesprozess beteiligten Zuckerarten Saccharose, Glukose und Fruktose (Marsh, 2003) nicht wesentlich in ihrer Kariogenität unterscheiden (Guggenheim et al., 1966; Colman et al., 1977), wurde in der vorliegenden Studie nur das Fermentationsvermögen von Saccharose getestet.

Da handelsübliches MRS-Medium einen sehr hohen Anteil an Glukose (20 g/l) hat, musste ein modifiziertes Medium hergestellt werden. Das modifizierte MRS-Medium von Hedberg et. al enthielt keine Glukose (Hedberg et al., 2008). Ziel vorliegender Studie war es, die Stoffwechsellleistungen von Streptokokken und Laktobazillen unter möglichst ähnlichen Bedingungen zu vergleichen. Da Laktobazillen bevorzugt in MRS-Medium wachsen, war es erforderlich die Streptokokken in BHI-Medium wachsen zu lassen, welches für diese Bakteriengruppe bessere Wachstumsbedingungen ermöglicht. Die Herstellung eines modifizierten BHI-Mediums, das keinen Zucker enthielt, war aber nicht möglich, da einige wichtige Inhaltsstoffe nicht einzeln zu erwerben waren. Daher wurde handelsübliches BHI-Medium mit einem Zuckergehalt von 2 g/l Glukose im Versuch genutzt. Für die Laktobazillen und *BB-12* wurde ähnlich wie bei Hedberg et. al (2008) ein modifiziertes MRS-Medium hergestellt, das den gleichen Glukosegehalt wie das BHI-Medium enthielt. Daher war der Fermentationstest genau genommen ein Test auf das Fermentationsvermögen von Saccharose und Glukose. Dieses Vorgehen erlaubte eine Abschätzung der allgemeinen Fermentationsleistung der Bakterienstämme. Diese Fermentationsleistung könnte auch abhängig sein von der Art des zugegebenen Zuckers. Die Untersuchung der Fermentationsleistung bei verschiedenen Zuckern war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Studie und sollte in weiteren In-vitro-Studien untersucht werden. Beim Vergleich der hier vorliegenden Werte mit den Daten der Studie von Hedberg et al. muss deshalb berücksichtigt werden, dass die probiotischen Stämme

hier eine marginal größere Menge an Zucker zur Verstoffwechslung zur Verfügung hatten (Hedberg et al., 2008).

Der Versuch wurde unter aeroben Bedingungen (5 % CO₂) durchgeführt und damit wurden Umgebungsbedingungen für einen neu etablierten Biofilm simuliert. Um die Bedingungen älterer Biofilme (komplex, viele gram-negative anaerobe Bakterien) zu simulieren (Bradshaw und Marsh, 1998), bedarf es weiterer Untersuchungen mit gleichem Versuchsaufbau unter anaeroben Bedingungen. Im Wesentlichen zeigten aber die Ergebnisse der Studie von Hedberg et al., dass es keinen elementaren Unterschied für die Fermentationsleistung darstellte, ob Biofilme unter aeroben oder anaeroben Bedingungen kultiviert worden waren (Hedberg et al., 2008).

Es gilt zu beachten, dass die vorliegende Studie nicht die Komplexität echter oraler Biofilme mit verschiedenen Zellen, Wirtsfaktoren und unterschiedlich konsumierten Kohlenhydraten widerspiegeln kann. Ziel dieser Untersuchung war es, beurteilen zu können, welche Probiotika potenziell kariogen sind. Die Aussagekraft der Ergebnisse diesbezüglich ist begrenzt. Sie reicht nicht aus, um damit eindeutig prognostizieren zu können, wie sich die Säureproduktion unter physiologischen Bedingungen auf die Zahnhartsubstanz auswirken würde. Daher wäre zunächst sinnvoll, in einer weiterführenden In-vitro-Studie den Effekt der bakteriellen Säureproduktion auf die Demineralisation von Zahnhartsubstanzen unter verschiedenen Umgebungsbedingungen zu untersuchen.

7.2.4. Messung der Adhäsion an S-HA

In der vorliegenden Untersuchung wurde zur Beurteilung des Adhäsionspotentials verschiedener Bakterien an der Zahnhartsubstanz eine zweistündige Inkubation von Bakterienzellsuspensionen (in PBS) mit einer genormten S-HA Disc durchgeführt. Dafür wurde der Versuchsaufbau von Simões et al. modifiziert (Simões et al., 2007). Es wurden statt natürlicher Zähne industriell hergestellte HA-Discs verwendet, da die Vergleichbarkeit der Proben gewährleistet sein musste. Vorteil dieser HA-Discs gegenüber bovinen und insbesondere menschlichen Zähnen ist, dass es keine Schwankungen im Mineralgehalt, Fluoridanteil und auch keine Unterschiede bezüglich der Probengeometrie und -größe gibt. Die Mehrheit von In-vitro-Adhäsionsuntersuchungen nutzte Hydroxylapatit anstelle echter Zähne (Gibbons et al., 1976; Haukioja et al., 2006; Stamatova et al., 2009; Terai et al., 2015). Um Mundhöhlenbedingungen zu simulieren, wurde durch Inkubation der HA-Discs mit

humanem Speichel eine Pellicel auf den Proben erzeugt. Durch komplementäre Rezeptormoleküle in der Pellicel (Gibbons, 1989) erhöht sich das Adhäsionspotential oraler Mikroorganismen an der Zahnhartsubstanz maßgeblich. Dass dies auch unter In-vitro-Bedingungen der Fall ist, bewiesen Untersuchungen, die das Adhäsionspotential ausgewählter Bakterien an HA mit und ohne Pellicel untersuchten und deutlich höhere Adhäsionswerte bei den Proben mit Pellicel fanden (Hillman et al., 1970; Clark et al., 1978). Dass eine in vitro gebildete Pellicel sich im Wesentlichen nicht von einer in vivo gebildeten Pellicel unterscheidet, konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Beide Pellicel enthalten dieselben Speichel-Makromoleküle und sind sich auch in ihrer Aminosäure- und Kohlenhydratzusammensetzung ähnlich (Hay, 1967; Ericson, 1968; Sönju und Rölla, 1973; Mayhall und Butler, 1976; Mayhall, 1977). Es ist daher zu erwarten, dass die Adhäsionseigenschaften von Bakterien an mit Speichel behandelten HA-Oberflächen und an Zähnen mit einer erworbenen Pellicel unter klinischen Bedingungen ähnlich sind (Clark et al., 1978).

Die Wirtsbedingungen unterschiedlicher Individuen haben großen Einfluss auf die Bindungskapazität oraler Bakterien (Busscher et al., 1999; Haukioja et al., 2006; Petti et al., 2001) und können im In-vitro-Ansatz nicht berücksichtigt werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde der Speichel von zwei kariesfreien Probanden genutzt. Die Bindungskapazität von Bakterien an die Pellicel kann bei jeder Person aufgrund von individueller Speichelzusammensetzung variieren. Diesen Fakt gilt es nicht zu vernachlässigen, wenn Daten, die aus unterschiedlichen Untersuchungen stammen, verglichen werden. Haukioja et al. konnten deutliche Unterschiede in der Bindungskapazität von LGG an HA messen, wenn die Pellicel mit Speichel verschiedener Individuen gebildet wurden (Haukioja et al., 2006). In vorliegendem Versuchsaufbau erfolgte zwar eine Simulierung der Bindung unter physiologischen Bedingungen, aber sie bezog sich nur auf die individuellen Faktoren der zwei speichelspendenden Personen. Gar nicht simuliert wurde der antibakterielle Effekt des Speichels, da die Bakterien in PBS und nicht im Speichel inkubiert wurden. Um aber an Mundoberflächen haften zu können, sollte ein probiotischer Keim den Abwehrmechanismen der Mundhöhle standhalten können. Eine Reihe organischer Bestandteile des Speichels sind antimikrobiell aktiv, darunter v.a. Lysozyme, Lactoferrin, Peroxidase und Agglutinine (Ekstrand und Zero, 2012). Eine Vorbehandlung von Laktobazillen mit Lysozymen führt zu einer signifikant schlechteren Adhäsion an S-HA (Stamatova et al., 2009). Erstaunlicherweise förderte in einer anderen Untersuchung Lysozym die Anhaftung einiger oraler Streptokokken,

darunter SS, an S-HA (Tellefson und Germaine, 1986). Ein Faktor, der ebenfalls von der Situation in der Mundhöhle abweicht, ist, dass die Bakterien in vorliegender Untersuchung nicht um Pellikel-Bindungsstellen konkurrieren mussten.

Der Adhäsionsvorgang ist ein komplexer Prozess, bei dem viele Faktoren (u.a. pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit) einen Einfluss haben. Die ausgewählte Inkubationstemperatur war angelehnt an die physiologische Mundhöhlentemperatur (37° C). Jedoch konnten Untersuchungen zeigen, dass die Temperatur kein ausschlaggebender Faktor für die individuelle Adhäsion von Bakterien zu sein scheint (Comelli et al., 2002). Die Adhäsion erfolgte bei neutralem pH-Wert und in einer aeroben Atmosphäre (5 % CO₂); damit wurden Bedingungen simuliert wie sie bei initialer Biofilmbildung herrschen (Bradshaw und Marsh, 1998).

Der anorganische Anteil von reifem Zahnschmelz besteht aus Hydroxylapatitkristallen und beträgt 96-97 Gew. % des Schmelzes; das übrige Gewicht setzt sich aus Wasser und organischem Material zusammen. Damit ist die chemische Zusammensetzung von Schmelz und reinem Hydroxylapatit sehr ähnlich. Währenddessen besteht Dentin nur zu 70 Gew. % aus anorganischem Material und 30 Gew. % aus organischem Material und Wasser (Mjör und Fejerskov, 1986). Daher ist es mit vorliegendem Versuchsaufbau nicht möglich, Rückschlüsse auf das Adhäsionsverhalten der untersuchten Stämme an Dentin zu ziehen. Ältere Patienten weisen aufgrund von Zahnfleischrezessionen häufig freiliegendes Wurzel dentin auf und leiden deshalb häufig an Wurzelkaries. Ein Grund, weshalb freiliegendes Dentin einem größeren Kariesrisiko ausgesetzt ist, könnte neben der gesteigerten chemischen Anfälligkeit von Dentin (Hoppenbrouwers et al., 1986) unter Umständen auch ein gesteigertes Adhäsionsvermögen oraler Bakterien an Dentin sein (Weerkamp et al., 1988). Um das Adhäsionsverhalten von Bakterien an Dentin zu untersuchen, bedarf es eines Versuchsaufbaus mit Dentinoberflächen, die möglichst identische Oberflächeneigenschaften aufweisen. Entsprechende industriell hergestellte Probekörper sind bisher noch nicht verfügbar.

8. Schlussfolgerungen

Innerhalb der Limitationen der vorliegenden In-vitro-Studie kann geschlussfolgert werden, dass *SO* und *LRPTA* für die Prävention und Therapie von Karies vielversprechende probiotische Bakterienstämme sind. Beide Probiotika zeigten eine vergleichsweise hohe ADS-Aktivität und waren selbst nicht kariogen. Das Potential von *SO* zur Kolonisation der Mundhöhle ist hoch, da dieser Stamm über ein hohes Adhäsionsvermögen zu S-HA verfügt. *LRPTA* hat ebenfalls gezeigt, dass er an S-HA adhären kann, wobei die geringeren Adhäsionswerte darauf schließen lassen, dass *LRPTA* ähnlich wie die meisten Laktobazillen einen bereits etablierten Biofilm zur Integration benötigt. *SS* und *LRDSM* sind weitere Stämme mit vergleichsweise guten Ergebnissen in allen drei Experimenten. Da *SS* aber bekanntermaßen nicht säuretolerant ist, würde er wahrscheinlich beim therapeutischen Einsatz als Probiotikum versagen. Die schlechten Adhäsionswerte von *LRDSM* und die deutlich höhere ADS-Aktivität von *LRPTA* lassen vermuten, dass *LRPTA* das besser geeignete Probiotikum der beiden *Lactobacillus reuteri* Stämme ist. Trotz vielversprechenden Eigenschaften von *SO* und *LRPTA* bleibt offen, inwiefern ähnliche Ergebnisse unter klinischen Bedingungen erzielt werden können, da die Komplexität der physiologischen Vorgänge innerhalb der Mundhöhle in vitro nicht simulierbar ist. Eine große Herausforderung für den Einsatz von Probiotika dürfte die effektive Besiedlung der Mundhöhle sein. Sofern dies möglich ist, scheinen die untersuchten Eigenschaften der Probiotika, insbesondere die ADS-Aktivität, vielversprechend zu sein, um einen positiven Einfluss auf Karies nehmen zu können. Bevor klinische Empfehlungen gegeben werden können, müssen jedoch weitere In-vitro-Studien folgen. Hier sollte insbesondere das Kolonisationsverhalten und die ADS-Aktivität der Keime in Multispeziesbiofilmen, sowie der Einfluss der Probiotikagabe auf den Mineralverlust verschiedener Zahnhartsubstanzen untersucht werden.

9. Zusammenfassung

Probiotika sind ein neuartiges Behandlungskonzept zur Prävention und Behandlung von Karies, von der insbesondere Risikogruppen mit hoher Kariesprävalenz profitieren können. Obwohl bereits unterschiedliche Probiotika kommerziell vermarktet werden, sind deren kariespräventive Effekte noch nicht ausreichend untersucht worden.

Ziel dieser Studie war es, verschiedene Probiotika auf drei für die Kariesprävention relevante Parameter (ADS-Aktivität, Säureproduktion nach Zugabe von Saccharose und Adhäsion an Hydroxylapatit) zu untersuchen. Eingeschlossen wurden insgesamt neun verschiedene Probiotika und ein *Streptokokkus mutans* Stamm als Kontrolle.

Entgegen unserer Nullhypothesen zeigten die verschiedenen Bakterienstämme signifikante Unterschiede bei allen drei untersuchten Parametern. *LRPTA* hatte eine signifikant höhere ADS-Aktivität als alle anderen Gruppen, gefolgt von *SO*. Bei fünf Stämmen (*SO*, *SS*, *LRPTA*, *LA-5*, *BB-12*) fiel im Fermentationstest innerhalb der 72 Stunden der pH-Wert nicht unter 6,8. Diese Stämme waren somit nicht selbst kariogen. Dagegen fiel der pH-Wert bei *F-19* und *LGG* unter einen kritischen Wert von 5,2. Im Adhäsionsversuch zeigte *SO* die signifikant höchste Adhäsionskapazität aller untersuchten Stämme. Die Adhäsion aller Laktobazillus- und Bifidobakterium-Stämme war signifikant geringer im Vergleich zu den Streptokokkus-Stämmen.

Von allen untersuchten probiotischen Stämmen zeigten *SO* und *LRPTA* die vielversprechendsten Ergebnisse. Beide hatten eine hohe ADS-Aktivität, waren nicht kariogen unter Zuckerzufuhr und haben bewiesen, dass sie zur Adhäsion an S-HA befähigt sind. Bevor klinische Empfehlungen gegeben werden können, sollte jedoch in weiteren In-vitro-Studien der Einfluss dieser Stämme auf vorhandene Biofilme und deren Demineralisation von Zahnhartsubstanzen untersucht werden.

10. Literaturverzeichnis

- Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, Korpela R. (2002). Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of Oral Biology*, 47(11):799–804.
- Alaluusua S, Renkonen OV. (1983). Streptococcus mutans establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. *Scandinavian journal of dental research*, 91(6):453–7.
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. (2012). Caries inhibiting and remineralizing effect of xylitol in vitro. *Journal of Oral Science*, 41(2):71–76.
- Apostolou E, Kirjavainen PV, Saxelin M, Rautelin H, Valtonen V, Salminen SJ, Ouwehand AC. (2001). Good adhesion properties of probiotics: A potential risk for bacteremia? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 31(1):35–39.
- Archibald M. (1944). Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 156:121–142.
- Arena ME, Saguir FM, Manca De Nadra MC. (1999). Arginine dihydrolase pathway in Lactobacillus plantarum from orange. *International Journal of Food Microbiology*, 47(3):203–209.
- Ashwin D, Vijayaprasad KE, Taranath M, Ramagoni NK, Nara A, Sarpangala M. (2015). Effect of probiotic containing ice-cream on salivary mutans streptococci (SMS) levels in children of 6-12 years of age: A randomized controlled double blind study with six-months follow up. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(2):6–9.
- Bao X, De Soet JJ, Tong H, Gao X, He L, Van Loveren C, Deng DM. (2015). Streptococcus oligofermentans inhibits Streptococcus mutans in biofilms at both neutral pH and cariogenic conditions. *PLOS ONE*, 10(6):1–11.
- Beal C, Louvet P, Corrieu G. (1989). Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of Streptococcus thermophilus 404 and Lactobacillus bulgaricus 398. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(2):148–154.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3):1001–1009.
- Bischoff SC, Manns MP. (2005). Probiotika, Präbiotika und Synbiotika: Stellenwert in Klinik und Praxis. *Deutsches Ärzteblatt*, 102(11):752–759.
- Bonnekoh B, Wevers A, Jugert F, Merk H, Mahrle G. (1989). Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. *Archives of Dermatological Research*, 281(7):487–490.
- Bowen WH, Eastoe JE, Cock DJ. (1966). The effect of sugar solutions on the pH of plaque in caries-active monkeys. *Archives of Oral Biology*, 11(8):833–837.
- Bradshaw DJ, Marsh PD. (1998). Analysis of pH-Driven Disruption of Oral Microbial Communities in vitro. *Caries Research*, 32(6):456–462.
- Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. (1989). Effects of Carbohydrate Pulses and pH on

- Population Shifts within Oral Microbial Communities in vitro. *Journal of Dental Research*, 68(9):1298–1302.
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM. (2002). Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries Research*, 36(2):81–86.
- Budin-Verneuil A, Maguin E, Auffray Y, Ehrlich DS, Pichereau V. (2006). Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(7):617–622.
- Burne RA, Marquis RE. (2000). Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiology Letters*, 193(1):1–6.
- Burne RA, Parsons DT, Marquis RE. (1991). Environmental variables affecting arginine deiminase expression in oral streptococci. In: Dunny GM, Cleary PP, McKay LL, Hrsg. *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci*. 276–280, Washington, DC: American Society for Microbiology;
- Burton JP, Wescombe PA, Cadieux PA, Tagg JR. (2011). Beneficial microbes for the oral cavity: Time to harness the oral streptococci? *Beneficial Microbes*, 2(2):93–101.
- Busscher HJ, Mulder AFJM, Van Der Mei HC. (1999). In vitro Adhesion to Enamel and in vivo Colonization of Tooth Surfaces by Lactobacilli from a Bio-Yoghurt. *Caries Research*, 33(5):403–404.
- Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingström P, Campus G. (2013). The use of probiotic strains in caries prevention: A systematic review. *Nutrients*, 5(7):2530–2550.
- Çağlar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. (2006). Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontologica Scandinavica*, 64(5):314–8.
- Çağlar E, Kavaloglu SC, Kuscu OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S. (2007). Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clinical Oral Investigations*, 11(4):425–429.
- Çağlar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. (2008a). A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 18(1):35–39.
- Çağlar E, Kuscu OO, Selvi Kuvvetli S, Kavaloglu Cildir S, Sandalli N, Twetman S. (2008b). Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontologica Scandinavica*, 66(3):154–8.
- Çağlar E, Topcuoglu N, Çildir SK, Sandalli N, Kulekci G. (2009). Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 19(5):377–381.
- Campus G, Cocco F, Carta G, Cagetti MG, Simark-Mattson C, Strohmenger L, Lingström P. (2014). Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clinical Oral Investigations*, 18(2):555–561.

- Casiano-Colon A, Marquis RE. (1988). Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6):1318–1324.
- Ten Cate JM, Cummins D. (2013). Fluoride toothpaste containing 1.5% arginine and insoluble calcium as a new standard of care in caries prevention. *Journal of Clinical Dentistry*, 24(3):79–87.
- Ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O, Kidd EAM. (2003). Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Fejerskov O, Kidd E, Hrsg. *Dental Caries. The Disease and Its Clinical Management*. 9–69, Oxford: Blackwell Publishing;
- Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. (2000). Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: Evidence for a discrete window of infectivity. *Infection and Immunity*, 68(7):4018–4023.
- Clark WB, Bammann LL, Gibbons RJ. (1978). Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. *Infection and Immunity*, 19(3):846–853.
- Cole AS, Eastoe JE. (1977). *Biochemistry and Oral Biology*. Bristol: John Wright & Sons, Ltd.
- Colman G, Bowen WH, Cole MF. (1977). The effects of sucrose, fructose, and a mixture of glucose and fructose on the incidence of dental caries in monkeys (*M. fascicularis*). *British Dental Journal*, 142(7):217–221.
- Comelli EM, Guggenheim B, Stinglele F, Neeser JR. (2002). Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *European Journal of Oral Sciences*, 110(3):218–224.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. (1987). Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology*, 41(1):435–464.
- Crow VL, Thomas TD. (1982). Arginine metabolism in lactic streptococci. *Journal of Bacteriology*, 150(3):1024–1032.
- Cunin R, Glansdorff N, Piérard A, Stalon V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological reviews*, 50(3):314–352.
- Curran TM, Lieou J, Marquis RE. (1995). Arginine deiminase system and acid adaptation of oral streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12):4494–4496.
- Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTV, Tabchoury CPM. (2000). Biochemical Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Formed in the Presence of Sucrose or Glucose and Fructose. *Caries Research*, 34(6):491–497.
- Dennis DA, Gawronski TH, Sudo SZ, Harris RS, Folke LEA. (1975). Variations in Microbial and Biochemical Components of Four-Day Plaque During a Four-Week Controlled Diet Period. *Journal of Dental Research*, 54(4):716–722.
- Devine DA, Marsh PD. (2009). Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *Journal of Oral Microbiology*, 1(1).
- Dibdin GH, Shellis RP. (1988). Physical and Biochemical Studies of *Streptococcus*

- mutans Sediments Suggest New Factors Linking the Cariogenicity of Plaque with its Extracellular Polysaccharide Content. *Journal of Dental Research*, 67(6):890–895.
- Dong Y, Chen YYM, Burne RA. (2004). Control of Expression of the Arginine Deiminase Operon of *Streptococcus gordonii* by CcpA and Flp. *Journal of Bacteriology*, 186(8):2511–2514.
- Edwardsson S. (1974). Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odontologisk revy supplement*, 32:1–143.
- Ekstrand KR, Zero DT. (2012). Die Ökologie der Mundhöhle. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR, Hrsg. Karies: Wissenschaft und Praxis. 4–18, Stuttgart: Georg Thieme Verlag;
- Ericson T. (1967). Adsorption to hydroxyapatite of proteins and conjugated proteins from human saliva. *Caries Research*, 1(1):52–58.
- Ericson T. (1968). Salivary glycoproteins: Composition and adsorption to hydroxylapatite in relation to the formation of dental pellicles and calculus. *Acta Odontologica Scandinavica*, 26(1–2):3–21.
- Fejerskov O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. *Caries Research*, 38(3):182–191.
- Fejerskov O, Kidd E. (2008). Dental Caries : The Disease and its Clinical Management. Oxford: Blackwell Munksgaard.
- Fejerskov O, Josephsen K, Nyvad B. (1984). Surface ultrastructure of unerupted mature human enamel. *Caries Research*, 18(4):302–314.
- Fernández CE, Giacaman RA, Tenuta LM, Cury JA. (2015). Effect of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB21 on the Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in a Dual-Species Biofilm Model. *Caries Research*, 49(6):583–590.
- Ferro KJ, Bender GR, Marquis RE. (1983). Coordinately repressible arginine deiminase system in *Streptococcus sanguis*. *Current Microbiology*, 9(3):145–149.
- Fisher FJ. (1968). A field survey of dental caries, periodontal disease and enamel defects in Tristan da Cunha. *British Dental Journal*, 125(0007–0610):447–453.
- Flichy-Fernández AJ, Ata-Ali J, Alegre-Domingo T, Candel-Martí E, Ata-Ali F, Palacio JR, Peñarrocha-Diago M. (2015). The effect of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri*-containing tablets in peri-implant mucositis: A double-blind randomized controlled trial. *Journal of Periodontal Research*, 50(6):775–785.
- Gamper M, Zimmermann A, Haas D. (1991). Anaerobic regulation of transcription initiation in the arcDABC operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 173(15):4742–4750.
- Gibbins HL, Yakubov GE, Proctor GB, Wilson S, Carpenter GH. (2014). What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120:184–192.
- Gibbons RJ. (1989). Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases. *Journal of Dental Research*, 68(5):750–760.
- Gibbons RJ, van Houte J. (1971). Selective Bacterial Adherence to Oral Epithelial

- Surfaces and Its Role as an Ecological Determinant. *Infection and Immunity*, 3(4):567–573.
- Gibbons RJ, Kapsimalis B. (1963). Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by *Streptococcus mitis*. *Archives of Oral Biology*, 8(3):319–329.
- Gibbons RJ, Socransky SS. (1962). Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques. Its relation to dental caries and microbial ecology of the oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 7(1):73–9.
- Gibbons RJ, Moreno EC, Spinell DM. (1976). Model delineating the effects of a salivary pellicle on the adsorption of *Streptococcus miteor* onto hydroxyapatite. *Infection and Immunity*, 14(4):1109–1112.
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. (2000). Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 119(2):305–309.
- Glockmann E, Panzner K, Huhn P, Sigusch BW, Glockmann K, Exemplare W, Micheelis W. (2011). Ursachen des Zahnverlustes in Deutschland. *IDZ-Information*, 2:1–34.
- Gordan V V, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D, Magnusson I. (2011). Could alkali production be considered an approach for caries control? *Caries Research*, 44(6):547–554.
- Gruner D, Paris S, Schwendicke F. (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 48:16–25.
- Guarner F, Schaafsma GJ. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3):237–238.
- Guggenheim B, König KG, Herzog E, Mühlemann HR. (1966). The cariogenicity of different dietary carbohydrates tested on rats in relative gnotobiosis with a *Streptococcus* producing extracellular polysaccharide. *Helvetica odontologica acta*, 10(2):101–13.
- Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnén H, Bonow BE, Krasse B. (1953). The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontologica Scandinavica*, 11(3–4):232–364.
- Hamada S, Slade HD. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews*, 44(2):331–384.
- Harris R, Nicoll AD, Adair PM, Pine CM. (2004). Risk factors for dental caries in young children: A systematic review of the literature. *Community Dental Health*, 21(1):71–85.
- Haslöf P, West CE, Karlsson Videhult F, Brandelius C, Stecksén-Blicks C. (2013). Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Research*, 47(6):559–565.
- Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovuo J. (2006). Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(5):326–332.

- Haukioja A, Loimaranta V, Tenovuo J. (2008a). Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(4):336–343.
- Haukioja A, Söderling E, Tenovuo J. (2008b). Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Caries Research*, 42(6):449–453.
- Hay DI. (1967). The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Archives of Oral Biology*, 12(8):937–946.
- He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hosoda M, Benno Y, Salminen S. (2001). Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Current Microbiology*, 43(5):351–354.
- Hedberg M, Hasslöf P, Sjöström I, Twetman S, Stecksén-Blicks C. (2008). Sugar fermentation in probiotic bacteria-an in vitro study. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(6):482–485.
- Hillman JD, van Houte J, Gibbons RJ. (1970). Sorption of bacteria to human enamel powder. *Archives of Oral Biology*, 15(9):899–903.
- Hoppenbrouwers PMM, Driessens FCM, Borggreven JPM. (1986). The Vulnerability of Unexposed Human Dental Roots to Demineralization. *Journal of Dental Research*, 65(7):955–958.
- Hoppenbrouwers PMM, Driessens FC, Borggreven JPM. (1987). The mineral solubility of human tooth roots. *Archives of Oral Biology*, 32(5):319–22.
- Horiuchi M, Washio J, Mayanagi H, Takahashi N. (2009). Transient acid-impairment of growth ability of oral Streptococcus, Actinomyces, and Lactobacillus: A possible ecological determinant in dental plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(4):319–324.
- van Houte J, Winkler KC, Jansen HM. (1969). Iodophilic polysaccharide synthesis, acid production and growth in oral streptococci. *Archives of Oral Biology*, 14(1):45–61.
- van Houte J, Gibbons RJ, Banghart SB. (1970). Adherence as a determinant of the presence of Streptococcus salivarius and Streptococcus sanguis on the human tooth surface. *Archives of Oral Biology*, 15(11):1025–1034.
- Huang X, Exterkate RAM, Ten Cate JM. (2012). Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. *Journal of Dental Research*, 91(12):1130–1134.
- Huang X, Schulte RM, Burne RA, Nascimento MM. (2015). Characterization of the arginolytic microflora provides insights into pH homeostasis in human oral biofilms. *Caries Research*, 49(2):165–176.
- Huang X, Palmer SR, Ahn SJ, Richards VP, Williams ML, Nascimento MM, Burne RA. (2016). A highly arginolytic Streptococcus species that potently antagonizes Streptococcus mutans. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7):2187–2201.
- Huang X, Zhang K, Deng M, Exterkate RAM, Liu C, Zhou X, Cheng L, Ten Cate JM. (2017). Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 82:256–262.
- Jalasvuori H, Haukioja A, Tenovuo J. (2012). Probiotic Lactobacillus reuteri strains ATCC

- PTA 5289 and ATCC 55730 differ in their cariogenic properties in vitro. *Archives of Oral Biology*, 57(12):1633–1638.
- Jin LJ, Lamster IB, Greenspan JS, Pitts NB, Scully C, Warnakulasuriya S. (2016). Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. *Oral Diseases*, 22(7):609–619.
- Jordan AR, Micheelis W. (2016). Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). *Köln Deutscher Zahnärzterverlag*.
- Kandler O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3):209–224.
- Keyes PH. (1960). The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Archives of Oral Biology*, 1(4):304–320.
- Keyes PH. (1968). Research in dental caries. *Journal of the American Dental Association*, 76(6):1357–1373.
- Kleinberg I, Jenkins GN, Chatterjee R, Wijeyeweera L. (1982). The Antimony pH Electrode and its Role in the Assessment and Interpretation of Dental Plaque pH. *Journal of Dental Research*, 61(10):1139–1147.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. (2002). Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3):486–505.
- Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson Å, Sinkiewicz G. (2006). Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish Dental Journal*, 30(2):55–60.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology*, 187(21):7193–7203.
- Kruis W, Frič P, Pokrotnieks J, Lukáš M, Fixa B, Kaščák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 53(11):1617–1623.
- Lee SH, Kim YJ. (2014). A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Archives of Microbiology*, 196(8):601–609.
- Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. (2000). Saliva and Dental Pellicle-A Review. *Advances in Dental Research*, 14(1):22–28.
- Liu L, Tong H, Dong X. (2012). Function of the pyruvate oxidase-lactate oxidase cascade in interspecies competition between *Streptococcus oligofermentans* and *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7):2120–2127.
- Liu Y, Burne RA. (2009). Multiple two-component systems modulate alkali generation in *Streptococcus gordonii* in response to environmental stresses. *Journal of Bacteriology*, 191(23):7353–7362.
- Liu Y, Dong Y, Chen YYM, Burne RA. (2008). Environmental and growth phase regulation of the *Streptococcus gordonii* arginine deiminase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16):5023–5030.

- Loesche WJ. (1986). Role of Streptococcus in Human Dental Decay. *Microbiological Reviews*, 50(4):353–380.
- Loesche WJ, Henry CA. (1967). Intracellular microbial polysaccharide production and dental caries in a Guatemalan Indian village. *Archives of Oral Biology*, 12(2):189–194.
- Makinen KK, Makinen PL, Pape Jr. HR, Allen P, Bennett CA, Isokangas PJ, Isotupa KP. (1995). Stabilisation of rampant caries: polyol gums and arrest of dentine caries in two long-term cohort studies in young subjects. *International Dental Journal*, 45(1):93–107.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1):130–135.
- Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJL. (2013). Global burden of oral conditions in 1990-2010: A systematic analysis. *Journal of Dental Research*, 92(7):592–597.
- Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC. (1988). Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries- susceptible individuals. *Journal of Dental Research*, 67(12):1468–75.
- Marquis RE, Bender GR, Murray DR, Wong A. (1987). Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(1):53–56.
- Marsh PD. (1991). Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proceedings of the Finnish Dental Society.*, 87(4):515–525.
- Marsh PD. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in dental research*, 8(2):263–271.
- Marsh PD. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149(2):279–294.
- Marsh PD. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research*, 38(3):204–211.
- Marsh PD. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - Implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6(1):1–7.
- Mattos-Graner R., Smith D., Kings W., Mayers M. (2000). Water insoluble glucan synthesis by mutan streptococcal strain correlates with caries incidence in 12-30month old children. *Journal of Dental Research*, 79:1371–1377.
- Mayhall CW. (1977). Amino acid composition of experimental salivary pellicles. *Journal of Periodontology*, 48(2):78–91.
- Mayhall CW, Butler WT. (1976). The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 5(6):358–370.
- Menaker L. (1980). The biologic basis of dental caries: an oral biology textbook. Hagerstown: Harper & Row.
- Mertz-Fairhurst EJ, Curtis JW, Ergle JW, Rueggeberg FA, Adair SM. (1998). Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: Results at year 10. *Journal of the American Dental Association*, 129(1):55–66.

- Meurman JH, Antila H, Salminen S. (1994). Recovery of lactobacillus strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 7(6):295–298.
- Meyer-Lückel H, Paris S. (2011). Kariesinfiltration. *Zahnärztliche Mitteilungen*, 101(24):323–340.
- Micheelis W, Schiffner U, Hoffmann T, Reis U, Schroeder E. (2006). Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). *Köln Deutscher Zahnärzterverlag*.
- Miller WD. (1889). Die mikroorganismen der Mundhöhle. Die örtlichen und allgemeinen Erkrankungen, welche durch dieselben hervorgerufen werden. 2. Auflage. Leipzig: G. Thieme.
- Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA. (2004). Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut*, 53(1):108–114.
- Minah GE, Loesche WJ. (1977). Sucrose metabolism by prominent members of the flora isolated from cariogenic and non cariogenic dental plaques. *Infection and Immunity*, 17(1):55–61.
- Minah GE, Solomon ES, Chu K. (1985). The association between dietary sucrose consumption and microbial population shifts at six oral sites in man. *Archives of Oral Biology*, 30(5):397–401.
- Mjör IA, Fejerskov O. (1986). Human oral embryology and histology. Kopenhagen: Munksgaard.
- Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, Santoro L, Cuoco L, Manna R, Gasbarrini G. (2004). Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: A double-blind, randomized, controlled study. *Digestion*, 69(1):53–56.
- Morou-Bermudez E, Elias-Boneta A, Billings RJ, Burne RA, Garcia-Rivas V, Brignoni-Nazario V, Suarez-Perez E. (2011). Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors. *Archives of Oral Biology*, 56(11):1282–1289.
- Moustafa HH, Collins EB. (1968). Molar growth yields of certain lactic acid bacteria as influenced by autolysis. *Journal of Bacteriology*, 96(1):117–125.
- Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. (2009). Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(2):89–95.
- Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X, Primosch RE, Burne RA. (2013). Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *Journal of Dental Research*, 92(7):604–8.
- Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH. (2001). Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children. *Caries Research*, 35(6):412–420.
- Newbrun E. (1967). Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odontologisk revy.*,

18(4):373–386.

- Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, Darmawan S, Hamada T, Hara K, Matsumoto A, Takemoto T, Aimi R. (2004). Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2):219–223.
- Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. (2009). Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3):407–50.
- Nyvad B, Kilian M. (1987). Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian journal of dental research*, 95(5):369–380.
- Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, Lescano AG, Meza R, Madico G. (1999). A placebo-controlled trial of Lactobacillus GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *Journal of Pediatrics*, 134(1):15–20.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1–4):279–289.
- Paris S, Ekstrand KR, Meyer-Lückel H. (2012). Von der Diagnostik zur Therapie. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR, Hrsg. Karies: Wissenschaft und Praxis. 147–156, Stuttgart: Georg Thieme Verlag;
- Petersen PE. (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community dentistry and oral epidemiology*, 31 Suppl 1:3–23.
- Petersson LG, Magnusson K, Hakestam U, Baigi A, Twetman S. (2011). Reversal of primary root caries lesions after daily intake of milk supplemented with fluoride and probiotic Lactobacilli in older adults. *Acta Odontologica Scandinavica*, 69(1):321–327.
- Petti S, Tarsitani G, D'Arca AS. (2001). A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Archives of Oral Biology*, 46(8):705–712.
- Pham LC, Hoogenkamp MA, Exterkate RAM, Terefework Z, De Soet JJ, Ten Cate JM, Crielaard W, Zaura E. (2011). Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on saliva-derived microcosms. *Archives of Oral Biology*, 56(2):136–147.
- Pitts NB, Boyles J, Nugent ZJ, Thomas N, Pine CM. (2007). The dental caries experience of 5-year-old children in Great Britain (2005/6). Surveys co-ordinated by the British Association for the study of community dentistry. *Community dental health*, 24(1):59–63.
- Prakobphol A, Xu F, Hoang VM, Larsson T, Bergstrom J, Johansson I, Frängsmyr L, Holmskov U, Leffler H, Nilsson C, Borén T, Wright JR, Strömberg N, Fisher SJ. (2000). Salivary agglutinin, which binds Streptococcus mutans and Helicobacter pylori, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51):39860–39866.
- Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. (2008). Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6):2015–2021.
- Prochaska HJ, Santamaria AB. (1988). Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for

- anticarcinogenic enzyme inducers. *Analytical Biochemistry*, 169(2):328–336.
- Ravn I, Dige I, Meyer RL, Nyvad B. (2012). Colonization of the oral cavity by probiotic bacteria. *Caries Research*, 46(2):107–112.
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR. (1999). Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: A randomised trial. *Lancet*, 354(9179):635–639.
- Rogers AH. (1990). Utilization of nitrogenous compounds by oral bacteria. *Australian Dental Journal*, 35(5):468–471.
- Rölla G. (1989). Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *European Journal of Oral Sciences*, 97(2):115–119.
- Romani Vestman N, Hasslöf P, Keller MK, Granström E, Roos S, Twetman S, Stecksén-Blicks C. (2013). *Lactobacillus reuteri* influences regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection: A double-blind, randomised controlled trial. *Caries Research*, 47(4):338–345.
- Schilling KM, Bowen WH. (1992). Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 60(1):284–295.
- Schwendicke F, Dörfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. (2014a). Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Research*, 48(3):186–192.
- Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dörfer C. (2014b). Effects of heat-inactivated *Bifidobacterium* BB12 on cariogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro. *Archives of Oral Biology*, 59(12):1384–1390.
- Schwendicke F, Korte F, Dörfer CE, Kneist S, Fawzy El-Sayed K, Paris S. (2017). Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro. *Caries Research*, 51(2):87–95.
- Shellis RP. (1996). A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine. *Archives of Oral Biology*, 41(5):473–484.
- Shellis RP. (2012). Ätiologie und Pathogenese der Karies. In: Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand KR, Hrsg. Karies: Wissenschaft und Praxis. 23–41, Stuttgart: Georg Thieme Verlag;
- Simões LC, Simões M, Oliveira R, Vieira MJ. (2007). Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2):174–183.
- Skougaard MR. (1970). Cell renewal, with special reference to the gingival epithelium. *Advances in Oral Biology*, 4:261–88.
- Sönju T, Rölla G. (1973). Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo: Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Research*, 7(1):30–38.
- Spano G, Chieppa G, Beneduce L, Massa S. (2004). Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1):185–193.

- Staat RH, Gawronski TH, Cressey DE, Harris RS, Folke LEA. (1975). Effects of dietary sucrose levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. *Journal of dental research*, 54(4):872–80.
- Stamatova I, Kari K, Vladimirov S, Meurman JH. (2009). In vitro evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(3):218–223.
- Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. (2009). Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: A cluster-randomized study. *Caries Research*, 43(5):374–381.
- Stensson M, Koch G, Coric S, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Birkhed D, Wendt L-K. (2013). Oral Administration of *Lactobacillus reuteri* during the First Year of Life Reduces Caries Prevalence in the Primary Dentition at 9 Years of Age. *Caries Research*, 48(2):111–117.
- Stephan RM. (1944). Intra-Oral Hydrogen-Ion Concentrations Associated With Dental Caries Activity. *Journal of Dental Research*, 23(4):257–266.
- De Stoppelaar JD, Van Houte J, Backer Dirks O. (1969). The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. *Caries Research*, 3(2):190–199.
- Ströhle A, Hahn A. (2012). Arginin bei Atherosklerose: Diätetische Maßnahmen bei Atherosklerose – Stellenwert von L-Arginin. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 21:74–83.
- Sung Y-H, Son H-H, Yi K, Chang J. (2016). Elemental analysis of caries-affected root dentin and artificially demineralized dentin. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 41(4):255.
- Szajewska H, Mrukowicz JZ. (2001). Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: A systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 33(4):17–25.
- Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM. (2014). Effect of Oral Administration Involving a Probiotic Strain of *Lactobacillus reuteri* on Pro-Inflammatory Cytokine Response in Patients with Chronic Periodontitis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6):495–500.
- Tanzer JM. (1995). Dental Caries is a Transmissible Infectious Disease: The Keyes and Fitzgerald Revolution. *Journal of Dental Research*, 74(9):1536–1542.
- Tanzer JM, Freedman ML, Woodiel FN, Eifert RL, Rinehimer LA. (1976). Association of *Streptococcus mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. In: Stiles H, Loesche WJ, O'Brien T, Hrsg. Microbial aspects of dental caries. 597–616, Washington, DC: Informations Retrieval;
- Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of dental education*, 65(10):1028–37.
- Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, Cakar G, Kadir T, Yilmaz S. (2015). Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: A 1-year follow-up study. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(4):363–

372.

- Tellefson LM, Germaine GR. (1986). Adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite coated with lysozyme and lysozyme-supplemented saliva. *Infection and Immunity*, 51(3):750–759.
- Tenovuo J, Hdkkinen P, Paunio P, Emilson CG. (1992). Effects of chlorhexidine-fluoride gel treatments in mothers on the establishment of mutans streptococci in primary teeth and the development of dental caries in children. *Caries Research*, 26(4):275–280.
- Terai T, Okumura T, Imai S, Nakao M, Yamaji K, Ito M, Nagata T, Kaneko K, Miyazaki K, Okada A, Nomura Y, Hanada N. (2015). Screening of probiotic candidates in human oral bacteria for the prevention of dental disease. *PLOS ONE*, 10(6):1–20.
- Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. (2013). Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: A randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(11):1025–1035.
- Tong H, Gao X, Dong X. (2003). *Streptococcus oligofermentans* sp. nov., a novel oral isolate from caries-free humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4):1101–1104.
- Tong H, Chen W, Merritt J, Qi F, Shi W, Dong X. (2007). *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H₂O₂: A possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Molecular Microbiology*, 63(3):872–880.
- Truin GJ, König KG, Bronkhorst EM, Frankenmolen F, Mulder J, Van 'T Hof MA. (1998). Time Trends in Caries Experience of 6- and 12-Year-Old Children of Different Socioeconomic Status in the Hague. *Caries Research*, 32(1):1–4.
- Weerkamp AH, Uyen HM, Busscher HJ. (1988). Effect of Zeta Potential and Surface Energy on Bacterial Adhesion to Uncoated and Saliva-coated Human Enamel and Dentin. *Journal of Dental Research*, 67(12):1483–1487.
- Wijeyeweera RL, Kleinberg I. (1989). Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediment and dental plaque in vitro. *Archives of Oral Biology*, 34(1):43–53.
- Wood JM. (1969). The state of hexose sugar in human dental plaque and its metabolism by the plaque bacteria. *Archives of Oral Biology*, 14(2):161–8.
- Wood JM, Critchley P. (1966). The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic streptococcus. *Archives of Oral Biology*, 11(10):1039–1042.
- Van Wuyckhuyse BC, Perinpanayagam HE, Bevacqua D, Raubertas RF, Billings RJ, Bowen WH, Tabak LA. (1995). Association of Free Arginine and Lysine Concentrations in Human Parotid Saliva with Caries Experience. *Journal of Dental Research*, 74(2):686–690.
- Xie H, Lin X, Wang BY, Wu J, Lamont RJ. (2007). Identification of a signalling molecule involved in bacterial intergeneric communication. *Microbiology*, 153(10):3228–3234.
- Yli-Knuutila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH. (2006). Colonization of *Lactobacillus*

rhamnosus GG in the oral cavity. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(2):129–131.

Zhang J, Tong HC, Dong XZ, Yue L, Gao XJ. (2010). A preliminary study of biological characteristics of streptococcus oligofermentans in oral microecology. *Caries Research*, 44(4):345–348.

Zúñiga M, Pérez G, González-Candelas F. (2002). Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25(3):429–444.

11. Anhang

11.1. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Moritz Stefan Wittner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Kariesprotektive Eigenschaften verschiedener Probiotika in vitro“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Material und Methoden (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum und Unterschrift Moritz Stefan Wittner

11.2. Publikationsliste

Publikation 1:

Posterpräsentation der Studienergebnisse „Anti-cariogenic properties of different probiotic bacteria in-vitro.“ (Autoren: Göstemeyer G, Wittner M, Paris S, Schwendicke F.) auf der 9. „ConsEuro Conference“ in Berlin, Deutschland, 14. – 15. Juni 2019.

11.3. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Moritz Wittner hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1:

Posterpräsentation der Studienergebnisse „Anti-cariogenic properties of different probiotic bacteria in-vitro.“ (Autoren: Göstemeyer G, Wittner M, Paris S, Schwendicke F.) auf der 9. „ConsEuro Conference“ in Berlin, Deutschland, 14. – 15. Juni 2019.

Beitrag im Einzelnen: Entwicklung, Etablierung und Durchführung der Versuche; Messung, Auswertung und Interpretation der Ergebnisse; Mitwirkung an der Erstellung des Präsentationsposters

Datum und Unterschrift Moritz Stefan Wittner

11.3. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11.4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Falk Schwendicke für die Überlassung des äußerst interessanten Dissertationsthemas und Herrn Dr. Gerd Göstemeyer für die sehr engagierte Betreuung und hilfreiche Unterstützung während der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke Frau Carola Schweynoch für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Einarbeitung und der Durchführung der labortechnischen Arbeiten und mindestens genauso sehr für ihre immer motivierenden und lieben Worte. Ebenso geht mein Dank an Frau Dr. Petra Ganas für ihre sehr engagierte Hilfestellung bei der Etablierung der Versuche sowie der Interpretation meiner Ergebnisse. Ohne diese beiden wäre weder das Arbeitsklima im Labor so angenehm noch an einen erfolgreichen Abschluss der Versuche zu denken gewesen.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Hans-Michael Hubberten, der sich zu Beginn dieser Arbeit viel Zeit genommen und mir wertvolle Ratschläge zu den Laborversuchen gegeben hat.

Zuletzt möchte ich mich bei den unermüdlichen Korrekturlesern, meinen Eltern und Miriam Schilling, bedanken, nicht nur für ihre hilfreichen (laut ihnen notwendigen) Korrekturen, sondern auch für alles andere. Danke!