universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Molekularbiologische Detektion der Lactobacillen Biodiversität in humanen Habitaten

Verfasserin

Iris Schuhmeister

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 441
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Genetik-Mikrobiologie
Betreuerin / Betreuer:	Prof. Dr. Angela Witte

Danksagung

Mein herzlicher Dank gebührt meinen Betreuern, Frau. a.o. Univ. Prof. Dr. Angela Witte und Herrn Dipl.-Ing. Dr. Konrad Domig, für die freundliche Unterstützung, die ausgezeichnete Betreuung und gute Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei Frau Mag. Marija Zunabovic sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene bedanken, die für meine Anliegen stets ein offenes Ohr hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein weiterer und ganz besonderer Dank gilt Frau Mag. Cathrin Janitschek, die meine ersten Schritte begleitet, und deren Geduld und Herzlichkeit das Einarbeiten in dieses Thema in freundschaftlicher Atmosphäre ermöglicht hat.

Das wohl größte Dankeschön richte ich an meine Eltern Renate und Peter Mildner, und an meine Freunde, Astrid Poljakovic, Naima Cuny-Pierron und Klaus Scharitzer, für die Liebe, die Geduld und die moralische Unterstützung mit der sie diese wichtige Phase meines Lebens begleitet haben.

Ich möchte diese Diplomarbeit meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit widmen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung: - 1 -
   1.1. Mikrobiota in Humanen Habitaten - 1 -
      1.1.1. Humane inestinale Mikrobiota - 2 -
      1.1.2. Humane vaginale Mikrobiota - 3 -
   1.2. Gattung *Lactobacillus* - 5 -
      1.2.1. Taxonomie - 5 -
      1.2.2. Morphologie und Physiologie - 6 -
      1.2.3. Lactobacillen der humanen intestinalen Mikrobiota - 7 -
      1.2.4. Lactobacillen der humanen, vaginalen Mikrobiota: - 9 -
      1.2.5. Einsatz von Lactobacillen in der Pharmazie - 11 -
2. Aufgabenstellung - 13 -
3. Material und Methoden - 14 -
   3.1. Mikrobiologische Methoden - 15 -
      3.1.1. Herstellung der Nährmedien - 15 -
      3.1.2. Semiquantitative Keimzahlbestimmung - 16 -
      3.1.3. Anlegen von Glycerinstock-Kulturen - 18 -
      3.1.4. Referenzstämme für Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese - 18 -
   3.2. Molekularbiologische Methoden - 19 -
      3.2.1. DNA Isolierung - 19 -
      3.2.2. Isolieren der DNA der Proben - 20 -
      3.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR) - 22 -
      3.2.4. Agarose Gelelektrophorese - 27 -
      3.2.5. DGGE– Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese - 30 -
      3.2.6. Reinigung für Sequenzierung - 34 -
      3.2.7. Sequenzierung - 34 -
      3.2.8. Auswertung mittels Bionumerics: - 35 -
4. Ergebnisse - 36 -
   4.1. Mikrobiologische Ergebnisse - 36 -
      4.1.1. Semiquantitative Keimzahlbestimmung - 36 -
   4.2. Molekularbiologische Ergebnisse - 58 -
      4.2.1. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) - 58 -
      4.2.2. Ergebnisse der Sequenzierung - 59 -
      4.2.3. Ergebnisse der DGGE ausgewertet durch Bionumerics - 64 -
      4.2.4. Enterokokken PCR - 76 -
5. Diskussion - 83 -
   5.1. Ergebnisse der Keimzahlbestimmung - 83 -
   5.2. Ergebnisse der PCR-DGGE - 83 -
      5.2.1. Auswertung mittels Bionumerics – Rektal: Tag 0 und Tag 14 - 91 -
      5.2.2. Auswertung mittels Bionumerics – Rektal: Tag 0 und Tag 28 - 92 -

5.2.3. Auswertung mittels Bionumerics – Rektal: Tag 14 und Tag 28 ..... - 93 -
5.2.4. Auswertung mittels Bionumerics – Vaginal: Tag 0 und Tag 14 ..... - 94 -
5.2.5. Auswertung mittels Bionumerics – Vaginal: Tag 0 und Tag 28 ..... - 95 -
5.2.6. Auswertung mittels Bionumerics – Vaginal: Tag 14 und Tag 28 ..... - 96 -
5.3. Interpretation ..... - 97 -
6. Zusammenfassung ..... - 103 -
7. Abstract ..... - 104 -
8. Literatur ..... - 105 -
9. Anhang ..... - 111 -
9.1. Zusammenfassung der Ergebnisse ..... - 111 -
9.2. DGGE Gele - Referenz für Bionumerics ..... - 127 -
9.3. Ergebnisse der Sequenzierung im Fasta Format ..... - 153 -
9.4. Abbildungsverzeichnis ..... - 166 -
9.5. Tabellenverzeichnis ..... - 169 -
9.6. Lebenslauf ..... - 170 -

1. Einleitung:

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis für das komplexe Zusammenspiel des menschlichen Organismus und der humanen Mikrobiota erheblich erweitert. Der Mensch wird nunmehr als „Super-Organismus“, als ein Verband humaner, somatischer Zellen und seiner spezifischen Mikrobiota betrachtet und verstanden. Die Zahl der Mikroorganismen, die ein humanes Individuum besiedeln ist wesentlich größer als die Anzahl der somatischen Zellen des Menschen selbst. Schätzungen gehen von einem Verhältnis von 10: 1 aus. Analog dazu wird das Mikrobiom des Menschen auf etwa 100-mal größer als das menschliche Genom geschätzt. Der Begriff „Mikrobiom“ wurde von Joshua Lederberg geprägt und bezeichnet die Gesamtheit der Genome aller, den Menschen besiedelnden, Mikroorganismen. Mikroorganismen spielen wichtige Schlüsselrollen in der Physiologie und Funktion jener Habitate die sie besiedeln. Ein detailliertes Verständnis für die Diversität des humanen Mikrobioms, und der Faktoren, die dessen Komponenten und Distribution beeinflussen, könnte neue Wege zur Erhaltung der menschlichen Gesundheit aufzeigen. (Turnbaugh et. al., 2007)

1.1. Mikrobiota in Humanen Habitaten

Humane Habitate für Mikroorganismen stellen neben Mundhöhle, Rachen, Nase, Lunge und Haut,vor allem der Intestinaltrakt und Urogenitaltrakt bei Frauen dar. Die Kolonisation, des im Uterus noch sterilen Fötus, durch Mikroorganismen, beginnt während der Geburt und währt das gesamte Leben. Leider ist noch sehr wenig über die Mechanismen der Besiedelung bekannt. Studien belegen jedoch das der Geburtsvorgang selbst sowie die Ernährung des Neugeborenen eine essentielle Rolle bei der Kolonisierung durch Mikroorganismen spielen. (McLoughlin et. al., 2011; Morelli et. al, 2008; Palmer et.al. 2007)

Durch die starke Besiedelung der Mikroorganismen und die daraus resultierende Koevolution mit dem Menschen hat das Mikrobiom essentielle Funktionen in der Physiologie des Menschen übernommen. Mikroorganismen schützen ihr Habitat gegen eine Invasion pathogener Bakterien, spielen eine wichtige Rolle im menschlichen Metabolismus und unterstützen sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem. (BÄCKHED et. al., 2005; MCLOUGHLIN, 2011; PALMER, 2007)

Einige dieser Mikrooganismen, besitzen jedoch auch pathogene Eigenschaften und sind die Ursache für entzündliche Darmerkrankungen, NEC (nekrotisierende Enterokolitis) aber auch Asthma; MALT (B-Zell-Lymphome des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes), und Magenkrebs. (BÄCKHED et al., 2005, HILL und ARTIS, 2010; PALMER, 2007)

1.1.1. Humane inestinale Mikrobiota

Mehr als $1x10^{14}$ Mikroorganismen besiedeln den Gastrointestinaltrakt in teils symbiotischen und teils kommensalen Beziehungen. Der Gastrointestinaltrakt weist, im Vergleich zu anderen humanen Habitaten, mit Abstand die größte Dichte an Mikroorganismen auf.

Die fermentativen Darmabschnitte des Menschen, und anderen Säugern, stellen für Mikroorganismen ein spezifisches Habitat zur Verfügung. Der ph-Wert liegt zwischen 5,5 bis 6,9. Im proximalen Colon finden sich höhere Werte, im distalen Niedrigere. Anaerobiose mit einem Redoxpotential zwischen -350 bis -400 mV, eine stabile Temperatur zwischen 37-41°C und eine Osmolalität von 250-350 mmol/kg sind weitere Faktoren die dieses Habitat spezifizieren. (HAMMES und HERTEL,2006; JANITSCHEK, 2010).

Obwohl das Vorkommen von Vertretern aller 3 Domänen - Archea, Bacteria and Eukarya - nachgewiesen wurde, dominieren die Bakterien mit einer typischen Dichte von 10^{11}-10^{12} Mikroorganismen/ml Luminalinhalt. Ungeachtet dieser hohen Anzahl an Bakterien, wurden nur acht, der 55 beschriebenen Divisionen, nachgewiesen, wobei zwei Divisionen, die der Firmicutes und Bacteroidetes, dominieren. (BÄCKHED et. al., 2005; Palmer, 2007).

Wie bereits erwähnt, beginnt die Kolonisierung durch Mikroorganismen unmittelbar nach der Geburt. Die Zusammensetzung dieser intestinalen Mikrobiota wird sowohl von Wirts- als auch von Umweltfaktoren, die im ersten Lebensjahr auf das Individuum wirken, beeinflusst. Schon wenige Wochen nach der Geburt verfügen sie über eine charakteristische Mikrobiota. Innerhalb des ersten Lebensjahres etabliert sich bei den meisten Neugeborenen eine stabile intestinale Mikrobiota, die der von Erwachsenen, in Bezug auf Quantität und Diversität, nahezu ident ist.
Erwachsene besitzen eine spezifische intestinale Mikrobiota die auch über Monate hinweg relativ stabil bleibt. Diese Spezifität der Mikrobiota deutet auf eine Interaktion zwischen den Mikroorganismen und dem Wirt hin, die durch natürliche Selektion, bestimmend auf ihre Zusammensetzung wirkt und eine Kolonisation des Gastrointestinaltrakts erlaubt. (BÄCKHED et. al.2005; MCLOUGHLIN et. al 2011, PALMER 2007)

Die intestinale Mikrobiota erfüllt eine Reihe von essentiellen Funktionen. Sie ist für den Abbau von Nahrungskomponenten verantwortlich und nimmt Einfluss auf die Aufnahme von Nährstoffen und den Fettstoffwechsel. Zusätzlich stellt sie dem Wirt essentielle Nährstoffe, die im Zuge des mikrobiellen Metabolismus generiert werden, zur Verfügung. Weiters stimuliert sie die Darmmorphologie und die intestinale Angiogenese. Die Mikrobiota schützt die endogenen Darmepithelzellen vor Schädigung und verhindert die Invasion von pathogenen Mikroorganismen, ein Phänomen das als Kolonialresistenz bezeichnet wird. Sie beeinflusst die Entwicklung und Differenzierung einzelner Komponenten sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems und ist essentiell in die Entwicklung der immunologischen Toleranz eingebunden. (ECKBURG et. al., 2005; JANITSCHEK, 2010; MULDER et al., 2009)

Unser Wissen über die Mikrobiota des Gastrointestinaltrakts stammt sowohl von kultur-abhängigen als auch kultur-unabhängigen Analysen humaner Faezes. (Bäckhead et. al 2005). Letztere bedienen sich eines molekular-phylogenetischen Ansatzes der auf der Sequenzierung des bakteriellen 16S rRNA Gens basiert. Diese Studien lieferten Erkenntnisse für die Diversität innerhalb und zwischen den untersuchten Individuen und trugen wesentlich zur Bestimmung und Klassifizierung der intestinalen Mikrobiota bei. (ARUMUGAN et. al 2011; ECKBURG et. al., 2005; JANITSCHEK, 2010; Qin et. al. 2010)

In den letzten Jahren entwickelte sich das Metagenome Sequencing zur Schlüsselmethode, um komplexe mikrobielle Ökosysteme zu erforschen. In einer Studie von Qin et. al, wurde die Ilumina Genome Analyser GA Technology vorgestellt, mittels der, die fäkale DNA von 124 Europäern, untersucht wurde. Aufgrund dieser Analyse wurden 3,3 Millionen Gene identifiziert, 150 x mehr als das menschliche Genom enthält. Diese Gene sind unter den einzelnen Individuen weit verbreitet und stammen zu 99% von Bakterien. Dies deutet darauf hin, dass innerhalb der Probanden 1,000 bis 1,150 Bakterien Arten vorherrschen. Jedes Individuum beherbergt mindestens 160 Arten. Eine weitere Studie, Arumugan et. al., verglich die fäkale DNA von 22 Europäern aus vier verschiedenen Ländern, mit der von 17, bereits untersuchten Individuen, aus den USA und Japan. Aufgrund der Zusammensetzung der Bakterien-Arten wurden drei spezifische Cluster (Enterotypes) identifiziert. Diese Enterotypes sind weder national- noch kontinentalspezifisch. Die Untersuchungen deuten jedoch auf die Existenz einiger weniger, gut balancierter symbiotischer Wirt-Mikrorganismen-Systeme hin. (ARUMUGAN et. al 2011; Qin et. al. 2010)

1.1.2. Humane vaginale Mikrobiota

Die humane vaginale Mikrobiota differiert sehr stark im Vergleich zur Mikrobiota anderer humaner Habitate. Bei gesunden Individuen finden sich etwa 10^7 – 10^8 KBE/g Vaginalflüssigkeit. Die vaginale Mikrobiota besteht aus einer Vielzahl anaerober, bakterieller Gattungen und Arten, u.a. Streptokokken, *E. coli, Corynebakterien, Ureaplasma* spp. und Anaerobier. Im Gegensatz zum Gastroinestinaltrakt und zur Mundhöhle mangelt es hier jedoch an der extrem hohen Diversität verschiedener Arten. Eine Tatsache, die wahrscheinlich im Fehlen von exogen zugeführten Nährstoffen, begründet ist. (FREDRICKS, 2011; MERK et. al 2004) Die gesunde Vaginalmikrobiota ist durch die Dominanz der fakultativen, mikroaerophilen, anaeroben Gattung *Lactobacillus* gekennzeichnet. (DONATI et al., 2010).

Die vaginale Mikrobiota erfährt signifikante Veränderungen während der verschiedenen Stadien der biologischen Reifung des Individuums. Schon während der Geburt beginnt die vaginale Besiedelung durch *Lactobacillus* Arten. Sie erfolgt oft durch mehrere Arten gleichzeitig und entspricht der maternalen Vaginalmikrobiota. Während der ersten sechs Wochen sorgt maternales Östrogen für die Bereitstellung glycogenreicher Substrate und fördert somit das Wachstum Glukose-fermentierender Mikroorganismen. In den darauf folgenden Wochen reduzieren sich diese glykogenreichen Substrate, ausgelöst durch den maternalen Östrogen Metabolismus. Dadurch

sinkt der vaginale ph-Wert und fördert das Wachstum und die Proliferation von aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien. Mit Beginn der Pubertät steigt der Östrogenspiegel und das glykogenreiche Milieu sorgt für die Selektion Glukose-fermentierender Mikroorganismen. (YAMAMOTO, 2009)

Die Zusammensetzung der vaginalen Mikrobiota ist, im Gegensatz zu der Mikrobiota des Gastrointestinaltrakts, nicht statisch. Sowohl exogene als auch endogene Faktoren können ihre Zusammensetzung, auch sehr kurzfristig, beeinflussen. Zu den endogenen Faktoren zählen der Anstieg an eisenhältigem Gewebe während der Menstruation, eine Schwangerschaft, aber auch der Gesundheitszustand oder ein hormonelles Ungleichgewicht, wie beispielsweise Östrogenmangel in der Menopause oder nach der Geburt. Unter exogene Faktoren fällt die Verwendung von Kontrazeptiva, eine gesteigerte Exposition für den Eintritt exogener Mikroorganismen durch Geschlechtsverkehr, variierende Sexualpartner, die Anwendung von Vaginalduschen, aber auch die Verwendung von Slipeinlagen oder Vaginal-Deos und die Einnahme von Antibiotika oder anderen Medikamenten, die das Immunsystem oder Stoffwechselvorgänge beeinflussen. Diese können zu Änderungen der Zusammensetzung der vaginalen Mikrobiota führen. (DONATI et al. 2011, FREDRICKS, 2011; GENC und ONDERDONK, 2011, JANITSCHEK, 2010;).
Die geringe Diversität der Bakterienarten deutet auf eine starke Selektion dieser spezifischen Mikrobiota hin. (FREDRICKS, 2011)

Auch die vaginale Mikrobiota erfüllt eine Reihe essentieller Funktionen. Sie schützt endogene Vaginalepithelzellen vor Schädigung und verhindert die Invasion von pathogenen Mikroorganismen (Kolonialresistenz). Sie beeinflusst den pH-Wert und verhindert dadurch das Wachstum von säuresensitiven Mikroorganismen. Die vaginale Mikrobiota ist nicht nur für wichtige gesundheitliche Auswirkungen bei Frauen sondern auch bei Neugeborenen verantwortlich. (DONATI et al., 2011; FREDRICKS, 2011; JANITSCHEK, 2010; SRINIVASAN et. al., 2010)

Ebenso wie bei der Erforschung der intestinalen Mikrobiota, wurden die kultur-abhängigen Methoden größtenteils von den kultur-unabhängigen Methoden abgelöst. Verschiedene molekulare Ansätze wurden entwickelt, um die vaginale Mikrobiota zu charakterisieren. Mittels Fermentationsprofilen, amplifizierender rDNA-Restriktionsanalyse (ARDRA) und Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorphismus (T-RFLP), sowie mittels denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) können sie nachgewiesen werden (FREDRICKS, 2011; JANITSCHEK, 2010; MARTINEZ et al., 2008).

1.2. Gattung *Lactobacillus*

Lactobacillen zählen, neben einigen Anderen, wie *Escherichia coli* zu den wichtigsten Symbionten der Mikrobiota des Menschen. Neben anderen Arten wie beispielsweise Enterokokken, werden sie der Gruppe der Lactic Acid Bacteria (LAB), oder auch Milchsäurebakterien (MSB), zugeordnet. Das primäre Fermentationsprodukt der Milchsäurebakterien ist Milchsäure, die unter physiologischen Bedingungen als Lactat vorliegt. (CANCHAYA, 2006; JANITSCHEK, 2010). Obwohl ihre Nahrungsanforderungen anspruchsvoll und komplex sind, sind sie in den verschiedensten Habitaten zu finden. Beispielsweise als Endosymbionten bei Mensch und Tier, auf Pflanzen und Material pflanzlichen Ursprungs. Sie gehören zu den ersten Mikroorgansmen die zur Konservierung und Produktion von Lebensmitteln eingesetzt wurden. In der modernen Nahrungs- und Futtermittelindustrie werden sie als Starter- und Schutzkulturen verwendet. Die intensive Erforschung der gesundheitsförderlichen Eigenschaften von Lactobacillen in Nahrungsmitteln, eröffnet neue Wege für den pharmazeutischen Einsatz als Probiotika. (BERNARDEAU et. al. 2006; JANITSCHEK, 2010)

1.2.1. Taxonomie

Die Gattung *Lactobacillus* wurde erstmals von Martinus Willem Beijernick im Jahr 1901 beschrieben. Im Jahre 1919 kam es zu einer Gliederung in drei Untergattungen, durch Sigurd Orla-Jensen, basierend auf ihrer optimalen Wachstumstemperatur und ihres Hexose-Katabolismus-Weges. (BERNARDEAU et al., 2006, JANITSCHEK, 2010).

Seitdem wurde die Nomenklatur der Lactobacillen mehrmals reorganisiert. Einerseits wegen der ständig wachsenden Zahl an neu identifizierten und beschriebenen Arten. Andererseits wegen einer Verlagerung der Charakterisierung von phenotypischen zu phylogenetischen Methoden, die neue Wege für die systematische Erforschung der inter- und intraspezifischen Diversität von Lactobacillen eröffnet hat. (BERNARDEAU et al., 2006)

Taxonomie der Gattung *Lactobacillus*. (Euzeby, 1997)

Tab. 1-1 Taxonomie der Gattung *Lactobacillus*

Domäne	*Bacteriea*
Abteilung	*Firmicutes*
Klasse	*Bacilli*
Ordnung	*Lactobacilliales*
Familie	*Lactobacillaceae*
Gattung	*Lactobacillus*

Basierend auf ihren fermentativen Eigenschaften werden sie seit 1986 in Bergey's Manual in folgende phenotypische Gruppen unterteilt. (BERNARDEAU et al., 2006)

• obligat homofermentativ
• heterofermentativ
• obligat heterofermentativ

Eine weitere, akzeptierte Nomenklatur, basierend auf phylogenetischen Merkmalen umfasst ebenfalls drei Gruppen: (BERNARDEAU et.al, 2006)

• *Lactobacillus delbrueckii* Gruppe
• *Lactobacillus casei/Pediococcus* Gruppe
• *Leuconostoc Gruppe*

Aufgrund der ständig wachsenden Zahl neu identifizierter und beschriebener Arten und phylogenetischen Untersuchungen bereits klassifizierter Arten, war die Nomenklatur der Gattung Lactobacillus, in der Vergangenheit ständigen taxonomischen Veränderungen unterworfen. (bestehende Arten wurden umbenannt oder Gattungen reklassifiziert). Dieser Prozess ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen und es ist damit zu rechnen dass die Systematik der Gattung Lactobacillus auch zukünftigen Veränderungen unterworfen ist. (BERNARDEAU et.al, 2006)

In der „Approved List of Bacterial Names“ von Jean Paul Euzéby sind zum jetzigen Zeitpunkt (Mai 2011) 173 Arten sowie 27 Unterarten eingetragen.

.

1.2.2. Morphologie und Physiologie

Lactobacillen sind gram–positive Bakterien. Ihre Form variiert von langen schlanken Stäbchen bis zu kurzen Kokken. Sie bilden keine Sporen. Sie sind mikroaerophil und chemo-organotroph. Ihr Metabolismus ist strikt fermentativ. Die meisten Arten sind aerotolerant, einige jedoch auch strikt anaerob. In der Regel sind sie Katalase-negativ, doch wurde in einigen Stämmen Pseudokatalaseaktivität nachgewiesen. Ihr GC-Gehalt liegt in der Regel unter 54% (FELIS et. al., 2007)

Lactobacillen werden physiologisch als einheitlich beschrieben, da sie zur Energiegewinnung auf Kohlehydrate angewiesen sind. Ihre obligat homofermentativen Vertreter fermentieren ausschließlich Hexosen über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP) zu Milchsäure, die unter physiologischen Bedingungen als Lactat vorliegt. Die Effizienz der exergonen, chemischen Umsetzung aus Glukose liegt bei mehr als 85% Lactat. Vertreter der fakultativ heterofermentativen Gruppe können neben Hexosen über den EMP-Weg ebenfalls Pentosen und oft auch Gluconate abbauen. Dies wird durch die Enzyme Aldolase und Phosphoketolase ermöglicht. Neben Lactat wird ebenfalls Kohlendioxid, Ethanol und/oder Essigsäure in equimolaren Mengen erzeugt. Obligat heterofermentative Vertreter bauen Hexosen über den Phosphogluconat-Weg ab. Auch bei

Vertretern dieser Gruppe wird neben Lactat, ebenfalls Kohlendioxid, Ethanol und/oder Essigsäure in equimolaren Mengen erzeugt. (STILES et al., 1997; BERNARDEAU et al., 2006; FELIS et al., 2007, HAMMES und HERTEL, 2006, JANITSCHEK, 2010)

Lactobacillen sind hochspezialisierte Symbionten mit komplexen Nährstoffansprüchen. Die Koevolution mit Wirten und Spezialisierung auf Nährstoff- und supplinreiche Habitate führte zur Entwicklung verschiedener Auxotrophien. Beispielsweise haben sie die Fähigkeit zur Synthese, verschiedener, essentieller Aminosäuren, Vitamine aber auch die, für Atmungsprozesse notwendigen, Porphyrine und Cytochrome, verloren. (VAN HYLCKAMA VLIEG et. al. 2006; WEGKAMP et al. 2009)

1.2.3. Lactobacillen der humanen intestinalen Mikrobiota

Analysen menschlicher Fäzes, zeigen dass nur ein kleiner Teil der gesamten humanen, intestinalen Mikrobiota aus Lactobacillen besteht. Sie konnten jedoch in allen Teilen des humanen Gastrointestinaltrakts nachgewiesen werden.

In dicht besiedelten Nischen, wie dem Gastrointestinaltrakt, befinden sich Lactobacillen mit anderen Bakterien in ständiger Konkurrenz um Nährstoffe. (Kleerebezem 2010) Die ökologischen Faktoren, die das Wachstum von Mikroorganismen im humanen Gastrointestinaltrakt bestimmen, variieren mitunter stark zwischen einzelnen Abschnitten. Oesuphagus (Speiseröhre) und Gastrum (Magen) gesunder Individuen beherbergen, quantitativ betrachtet, nur eine geringe Mikrobiota. Da nur wenige Arten die sauren Bedingungen im Magen (ph Wert: 3), tolerieren können, ist die Zusammensetzung und Diverisität der Mikrobiota ebenfalls extrem reduziert. Sie besteht hauptsächlich aus Lactobacillen und Streptokokken bzw. Enterokokken.

Die Mikrobiota des Duodenum (Zwölffingerdarm) und Jejunum (Leerdarm) ist etwas dichter als die des Gastrum. Lactobacillen und Enterokokken sind die dominierenden Arten. (HAMMES und HERTEL, 2006; JANITSCHEK, 2010; MACFARLANE und DILLON, 2007)
Im Ileum (Krummdarm) wird die Mikrobiota dichter und komplexer, gleiches gilt für Intestinum crassum (Dickdarm). Der Anteil an Lactobacillen ist, im Gegensatz zu den oben genannten Abschnitten des Gastrointestinaltrakts, stark reduziert. (HAMMES und HERTEL, 2006; JANITSCHEK, 2010; MACFARLANE und DILLON, 2007)

Kulturabhängige und–unabhängige Studien, fäkaler Proben gesunder Individuen wiesen *L. ruminis, L. crispatus, L. gasseri, L. plantarum, L. acidophilus, L. delbrueckii, L. casei, L. paracasei* und *Leuconostoc argentinum*, als die am häufigsten vorkommenden Vertreter der intestinalen Lactobacillen aus. Analysen intestinaler Biopsien gesunder Individuen, identifizierten *L. ruminis, L. gasseri, L. vaginalis* and *Leuconostoc mesenteroides* als die am häufigsten vorkommenden Vertreter. Eine weitere Studie, basierend auf der Oberflächen-Plasmon-Resonanz zeigte, dass

L. salivarius (26%), L. fermentum (13%), L. gasseri (10%), L. paracasei (7%), L. casei (3%), L. mucosae(3%) und *L. plantarum (3%)* die dominant vorkommenden Arten sind. Die Analyse fäkaler Proben von Kindern ergab das dominante Auftreten von *L. acidophilus, L. casei/paracasei* und *L. salivarius* (FAKHRY et al., 2009, JANITSCHEK, 2010).

Die Mikrobiota des Gastrointestinatraktes ist nach der Kindheit relativ stabil, unterliegt jedoch, ebenso wie die vaginale Mikrobiota, diversen exogenen und endogenen Einflüssen wie, Ernährung, Einnahme von Arzneimittel, Mikroorganismen, Herbiziden, Fungiziden, Erkrankungen des Darmtrakts, systemischen Erkrankungen, hormonelle Störungen. (McLoughlinn et. al., 2011; Morelli et. al, 2008; Palmer et.al. 2007)

Lactobacillen fördern die Darmgesundheit durch vielfältige Mechanismen. Sie sorgen für eine Verbesserung der mikrobiellen Balance im Gastrointestinaltrakt. Durch Produktion von Lactat und Essigsäure sorgen sie für ein saures Milieu im Gastrointestinaltrakt und inhibieren somit die Kolonisation und Ausbreitung von säuresensitiven Pathogenen. (McLoughlinn et. al., 2011)

Eine der wichtigsten Charakteristika von Lactobacillen ist die Fähigkeit sich an Schleimhautzellen anzulagern. Hierbei konkurrieren Lactobacillen direkt mit pathogenen Mikroorganismen um die Adhärenz an intestinale Epithelzellen. Der dadurch gebildete Biofilm inhibiert den Befall von Darmepithelzellen mit verschiedenen, Diarrhöe-auslösenden Mikroorganismen (Kolonialresistenz). Dieselben Mechanismen (Ansäuerung und Kolonialresistenz) verhindern auch eine Kolonisation des Dünndarms mit E. coli Arten aus dem Dickdarm. (DIEP et al., 2009)

Die Produktion von toxischen Hydroxylradikalen und verschiedenen Peptid-Bacteriocinen inhibiert andererseits direkt das Wachstum pathogener Mikroorganismen, wie beispielsweise Listeriosen die durch *Listeria* spp. ausgelöst werden. Die Zahl der Listeriosen als Folge von Lebensmittelinfektionen – mit teils tödlichem Ausgang – ist in den letzten Jahren in Europa angestiegen. (DIEP et al., 2009, EIJSINK V.G.H., 2002)

Im Gegensatz, zu den typischerweise vaginal-vorkommenden Lactobacillen Arten, hat die Wasserstoffperoxid–Produktion im Gastrointestinaltrakt keine Relevanz. Studien zeigten, dass die Produktion von Wasserstoffperoxid sowohl im Gastrointestinaltrakt, als auch in der Umwelt eher eine Ausnahme darstellt, selbst wenn sie vaginal vorkommen, wie beispielsweise *L. plantarum* und *L. paracasei.* (MARTIN und SUÁREZ, 2010)

Lactobacillen inhibieren nicht nur pathogene Mikroorganismen sondern stimulieren auch das Immunsystem. Sie beeinflussen die Entwicklung und Differenzierung einzelner Komponenten sowohl des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems und sind essentiell in die Entwicklung der immunologischer Toleranz eingebunden. (ECKBURG et. al., 2005; JANITSCHEK, 2010; MCLOUGHLINN et al. 2011; MULDER et al., 2009)

Eine zusätzliche Funktion könnte den intestinalen Lactobacillen auch als Reservoir für die vaginale Lactobacillenmikrobiota zufallen. Reid et al., 2003 und Morelli et. al, 2004, wiesen oral aufgenommene Lactobacillen nach der Darmpassage in der vaginalen Mikrobiota nach. Der positive Einfluss auf die Scheide ist durch eine direkte Kolonisation der Keime über das Perineum vorstellbar. Ebenso konnte Reid et al., 2003 in einer Studie an gesunden Frauen nachweisen, dass sich *L. rhamnosus* und *L. fermentum* nach oraler Einnahme vaginal ansiedeln und vermehren können.

Eine Studie von Antonio et al., 2005 belegte dass das Risiko einer bakteriellen Vaginose durch die Kolonisation des Gastrointestinaltrakts und in Folge des Rektums mit Lactobacillen signifikant reduziert und die normale Scheidenflora positiv beeinflusst wurde.

1.2.4. Lactobacillen der humanen, vaginalen Mikrobiota:

Die gesunde Vaginalmikrobiota ist durch die Dominanz der Gattung *Lactobacillus* gekennzeichnet (DONATI et al., 2010). Ergebnisse rezenter Studien divergieren jedoch über die Zusammensetzung einer „Standard-Lactobacillenmikrobiota". Molekularbiologische Untersuchungen unterschiedlicher Völker und Bevölkerungsgruppen (adoleszent, post-menopausal) wurden durchgeführt. Es scheint, neben exogenen und endogenen Faktoren, auch eine mögliche geographische und volkszugehörige Variation innerhalb der normalen Lactobacillenmikrobiota eine wichtige Rolle zu spielen. Für dieses Phänomen könnten sowohl genetische und Umwelt-Faktoren, aber auch die Ernährung eine Erklärung bieten. (LAMONT et. al., 2011) Eine weitere Unschärfe ergibt sich aus der Tatsache, dass die Mehrheit dieser Studien nur Momentaufnahmen zeigen, und deswegen als statisch anzusehen sind. Weder kurzfristige noch längerfristige Alternationen der Diversität der vaginalen Mikrobiota können dadurch erfasst werden. (LAMONT et. al., 2011)

Trotz dieser Unschärfe stellt der Nugent Score, nach Nugent et. al. 1991, eine anerkannte Methode um eine Aussage über die gesundheitlich relevante Zusammensetzung der vaginalen Mikrobiota zu treffen, dar. Dieses standardisierte Auswertungssystem klassifiziert den Status der vaginalen Mikrobiota, beruhend auf einer Gramfärbung des Vaginalabstrichs als „normal", „intermediär" oder „bakterielle Vaginose". [NUGENT et al., 1991; JANITSCHEK, 2010, SHIN und KAUL, 2008]

Von, bis jetzt über 170 entdeckten Lactobacillen Arten wurden mehr als 20 in der vaginalen Mikrobiota entdeckt. Rezente, molekularbiologische Studien zeigen, dass die Vaginalmikrobiota eines Individuums nicht aus vielen verschiedenen Arten zusammensetzt ist. Vielmehr dominieren ein oder zwei Arten von drei oder vier weit verbreiteten Lactobacillen-Arten, wohingegen andere Arten, seltener und in geringerer Quantität auftreten. (LAMONT et. al., 2011) Bei den dominanten Arten handelt es sich vor allem um *L. crispatus* und *L. iners*, aber auch *L. gasseri,* gefolgt von *L. jensenii, L. gallinarum* und *L. vaginalis*. (JANITSCHEK, 2010, LAMONT et. al., 2011)

Lactobacillen fördern das vaginale Milieu durch verschiedene Mechanismen:

- Produktion von Lactat, Wasserstoffperoxid, toxischen Hydroylradikalen und Bacteriocinen
- Adhäsion an vaginale Epithelzellen
- Koaggregation mit pathogenen Mikroorganismen
- Autoaggregation

(GIL et al., 2010, LAMONT et. al., 2011)

Die Produktion von Lactat unter Östrogeneinfluss fördert die Acidität des Vaginalmilieus. Dieses Säuremilieu mit einem pH-Wert zwischen 3,5 und 4,5 verhindert die Vermehrung krankheitserregender Bakterien. Es stellt den wichtigsten Schutz gegen Infektionen dar, da das Wachstum von säuresensitiven Mikroorganismen inhibiert wird. (DONATI et al., 2010)

Unter den typischen, vaginal assoziierten, Lactobacillen Arten ist die Fähigkeit zur Wasserstoffperoxid-Produktion weit verbreitet. MARTIN und SUÁREZ, 2010, zeigten, in einer Studie jedoch, dass nicht alle Wasserstoffperoxid-produzierenden Lactobacillen die gleiche Protektivität gewähren. Als Arten mit der höchsten Effizienz wurden *L. crispatus* and *L. jensenii* identifiziert. Die durch Lactobacillen verursachte Wasserstoffperoxid - Produktion verursacht eine direkte Inhibition des Wachstums anderer pathogener Mikroorganismen. Rezente Studien zeigten, dass Frauen mit einem reduzierten Vorkommen an Wasserstoffperoxid-produzierender Vaginamikrobiota ein erhöhtes Risiko tragen, an bakterieller Vaginose zu erkranken. Die bakterielle Vaginose ist eine der häufigsten Erkrankungen für Frauen im fruchtbaren Alter. Sie ist durch Reduktion oder das Fehlen von Lactobacillen und dem daraus resultierenden Anstieg an anaeroben gram-negativen Stäbchen, wie beispielsweise *Gardnerella vaginalis,* verschiedene *Mobiluncus* Arten und *Mycoplasma hominis,* mikrobiologisch charakterisiert. Die unkontrollierte Ausbreitung von *Gardnerella vaginalis* führt beispielsweise zu bakterieller Vaginose, während die Kolonisation mit Pathogenen, wie *Candida spp*. und *Trichomonas vaginalis* zu Vaginitis, Cervitis und lokalen und systemischen Problemen führen kann. (ANTONIO et al., 2009, JANITSCHEK et al. 2010; MARTIN und SUÁREZ, 2010).

Gemeinsam mit der Produktion antimikrobieller Substanzen und der Beeinflussung der Immunantwort des Wirtes, ist die Fähigkeit sich an Schleimhautzellen anzulagern, eine der wichtigsten Charakteristika von Lactobacillen. Hierbei konkurrieren Lactobacillen direkt mit pathogenen Mikroorganismen um die Adhärenz an vaginale Epithelzellen, dies führt zum Schutz gegen Genitalinfektionen durch Kolonialresistenz. Dadurch kann eine weitere Besiedelung mit pathogenen Arten eingeschränkt werden (MERK et al., 2005).

1.2.5. Einsatz von Lactobacillen in der Pharmazie

Aufgrund, der langen Verwendung in der Lebensmittelindustrie (Fermentationsprozessen und Nahrungsmittelkonservierung) und ihrer symbiotischen Beziehung mit Mensch und Tier wurden Lactobacillen, abgesehen von ihrer Beteiligung an Karies, nicht als potentielle Pathogene betrachtet. Sie wurden deswegen als GRAS (generally recognized as safe) für den humanen Konsum eingestuft. Dank dieses GRAS-Status und ihrem autochtonen Vorkommen in der humanen Mikrobiota sind Lactobacillen hochgradig attraktiv für den therapeutischen Einsatz. Die Nutzung von Lactobacillen „ghost shells“, als Vehicle für den *in situ* Transport von Antigenen und Medikamenten ist für die Forschung von großem Interesse. (DIEP et al., 2009) Ebenso hat die Entwicklung und der Einsatz von Lactobacillen als „Probiotika“, eine zunehmende Bedeutung als Functional Food in der Ernährung oder als Nahrungsergänzungsmittel sowohl für die Medizin als auch für die Wirtschaft bekommen. (GUARNER und SCHAAFSMA, 1998)

Der Terminus “Probiotika" wurde zum ersten Mal im Jahre 1965, von Lilly und Stillwell verwendet um Substanzen, die von einem Organismus abgesondert werden, um das Wachstum eines anderen zu stimulieren, zu beschreiben. (SCHREZENMEIR J. und DE VRESE, 2001)

Die moderne Definition der WHO und der Food and Agriculture Organization of the United Nations, beschreibt Probiotika als lebende, nicht pathogene Mikroorganismen - die in ausreichender Zahl verabreicht - einen präventiven oder therapeutischen Effekt auf den Makroorganismus haben, ihm also einen gesundheitlichen Nutzen bringen“. (WHO, 2002)

Die US Food and Drug Administration (FDA) bezeichnet Probiotika, die als Heilmittel in der Humanmedizin eingesetzt werden, als „lebende Biotherapeutika“ (JANITSCHEK, 2010; SANDERS, 2008).

Die positiven Effekte, die der therapeutische Einsatz von Probiotika auf den menschlichen Organismus hat, wurden mehrfach klinisch nachgewiesen. Sie decken sich weitgehend mit den Funktionen, die die normale Lactobacillenmikrobiota eines gesunden Individuums erfüllt. Diese Eigenschaften sind stammspezifisch und erfordern somit detailliertes Wissen über spezielle Charakteristika verschiedener Lactobacillenstämme und ein grundlegendes Verständnis für die Wechselwirkung mit dem humanen Organismus.

Untersuchungen zeigten, dass die normale vaginale Mikrobiota, durch das das Einbringen exogener probiotischer Lactobacillus-Stämme, wiederhergestellt werden konnte. (ANTONIO et al., 2009). Ebenfalls wurde die erfolgreiche Behandlung von bakterieller Vaginose durch die orale Gabe von *L. fermentum RC-14* und *L. rhamnosus GR-1* Stämmen beschrieben. (GIL et al., 2010) Für *L. rhamnosus GR-1*, wurde ebenfalls die erfolgreiche Behandlung von Harnweginfektionen postuliert. (ABAD und SAFDAR , 2009). Durch klinische Untersuchungen wurde nachgewiesen,

dass die gezielte Gabe von Lactobacillen-Präperaten die Symptome einer Lactose-Intoleranz kompensieren können. (OJETTI et al. 2010)

Einzelne Stämme der Arten *L. acidophilus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* und *L. reuteri* wurden bisher als Probiotika beschrieben.(JANITSCHEK, 2010, LIONG, 2007).

Im Rahmen der Anwendung als Probiotika, besteht ein wachsendes Interesse, Lactobacillen nicht nur zur Wiederherstellung der Gesundheit einzusetzen, sondern ebenfalls Strategien zu entwickeln, die die humane Mikrobiota im Kontext der Physiologie des Individuums zu optimieren. (Turnbaugh et. al., 2007)

2. Aufgabenstellung

Lactobacillen zählen neben *Escherichia coli* und *Bifidobakterien* zu den wichtigsten humanen Symbionten. Sie werden vor allem in den Schleimhäuten von Mund, Vagina und Rektum in großer Zahl gefunden. Sie leisten einen wichtigen Beitrag zur Gesundheit, einerseits indem sie die Ausbreitung und Besiedelung, krankheitsergender Mikroorganismen in ihrem Habitat verhindern, ein Phänomen, das als Kolonialresistenz bezeichnet wird. Andererseits wiesen neuere Studien auf eine immunologisch-relevante Funktion von Lactobacillen im menschlichen Körper hin.
Lactobacillen spielen von allen humanen Habitaten, vor allem in der Vagina eine große Rolle. Ihre Minimierung in diesem Habitat kann bakterielle Vaginose zur Folge haben. Durch das menopausal ausgelöste Sinken des Östrogenspiegels sind vor allem Frauen, mit zunehmendem Alter diesem Risiko verstärkt ausgesetzt.

Die medizinische Forschung beschäftigt sich schon seit einigen Jahren mit den Möglichkeiten diese Reduktion der Lactobacillen durch die Verabreichung von Probiotika auszugleichen bzw. zu minimieren. Der Schwerpunkt der Forschung richtet sich in den letzten Jahren vor allem auf die orale Verabreichung von Probiotika. Für die Entwicklung einer optimalen Behandlung ist es essentiell, die Lactobacillenmikrobiota in humanen Habitaten detailliert zu erforschen.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde die Diversität und Variation von Lactobacillen bei 44 gesunden postmenopausalen Frauen über einen Zeitraum von 28 Tagen untersucht. Bei den zu untersuchenden Proben handelt es sich um Abstriche aus Vagina und Rektum. Nach der mikrobiologischer Keimzahlbestimmung wurden die Proben molekularbiologisch mittels PCR-DGGE untersucht, mit anschließender Sequenzierung ausgewählter Einzelbanden.
Ein weiteres Ziel dieser Diplomarbeit war der Vergleich mit einer vorausgegangenen Studie an postmenopausalen Frauen (JANITSCHEK, 2010) durchgeführt wurde. Bei diesem Vergleich sollte die Dominanz einzelner Arten bzw. Unterschiede nachgewiesen werden.

Diese Studie wurde mit freundlicher Genehmigung der Ethik-Komission der medizinischen Fakultät und des AKH Wien durchgeführt.

3. Material und Methoden

Die Abstriche von 44 post-menopausalen Frauen wurden vom AKH Wien, Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Abteilung für Geburtshilfe und feto-maternale Medizin zur Vefügung gestellt und in Amies Transportmedium befördert. Die Untersuchung erfolgte ehebaldigst nach Erhalt der Abstriche.

Die Probandinnen nahmen über einen Zeitraum von 14 Tagen oral ein Probiotikum bzw. ein Placebo zu sich. Von jeder Probandin wurden, zu drei verschiedenen Zeitpunkten, je ein rektaler und ein vaginaler Abstrich genommen. Die erste Probennahme erfolgte am Tag 1 dem Zeitpunkt des Beginns der Einnahme des Probiotikums. Die zweite Probennahme erfolgte am 14 Tag, also dem letzten Tag der Einnahme des Probiotikums. Die dritte Probennahme erfolgte 14 Tage nach der letzten Probiotikeinnahme. Von jedem Abstrich wurde mit kultureller Methodik eine semiquantitative Keimzahlbestimmung durchgeführt. Anschließend wurden weitere Analysen mit molekularbiologischen Techniken durchgeführt.

```
Codierung: Nummer der Probandin: 1-50
           Zeitpunkt der Abnahme: 1 = Tag 0
                                  2 = Tag 14
                                  3 = Tag 28
                        Habitat: b = vaginal
                                  c = rectal

Beispiel: 1/1b = Probandin: 1, Zeitpunkt: Tag 0, Habitat: vaginal

Fehlende Abstriche: 1/1c, 1/2c, 1/3c, 2/3b, 2/3c, 7/3b, 7/3c,
                    8/3b, 8/3c, 15/1b, 15/2b, 15/3b, 15/1c, 15/2c,
                    15/3c, 16/1b, 16/2b, 16/3b, 16/1c, 16/2c,
                    16/3c, 17/1b, 17/2b, 17/3b, 17/1c, 17/2c,
                    17/3c, 30/3b, 30/3c, 34/3b, 34/3c, 45/1b,
                    45/2b, 45/3b, 45/1c, 45/2c, 45/3c, 48/1b,
                    48/2b, 48/3b, 48/1c, 48/2c, 48/3c, 49/1b,
                    49/2b, 49/3b, 49/1c, 49/2c, 49/3c,
```

3.1. Mikrobiologische Methoden

Die Intention der im folgendem beschriebenen Arbeitsschritte war, die Keimzahlen der Abstriche semiquantitativ zu bestimmen.
Mittels einer Variante des 1881 von Robert Koch entwickelten Plattenverfahrens, dem Oberflächenspatelverfahrens, wurde ein Aliquot jeder Probe auf MRS-Agar Platten transferiert.
Das Koch'sche Plattenverfahren ist eine der zuverlässigsten Keimzählmethoden, mit einer hohen Genauigkeit bei der Keimzahlbestimmung. Im Vergleich zum Plattengussverfahren, liegt der Vorteil des Oberflächenspatelverfahrens darin dass die Kolonien direkt an der Agaroberfläche zugänglich sind und einer Schädigung der Keime vorgebeugt wird. (JANITSCHEK, 2010; PICHHARDT, 1998).

3.1.1. Herstellung der Nährmedien

MRS-Agar
Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Art.Nr.1.10660

Zusammensetzung (g/l)
- Pepton aus Casein 10,0
- Fleischextrakt 10,0
- Hefeextrakt 4,0
- D(+)-Glucose 20,0
- di-Kaliumhydrogenphosphat 2,0
- Tween 80 1,0
- di-Ammoniumhydrogencitrat 2,0
- Natriumacetat 5,0
- Magnesiumsulfat 0,2
- Mangansulfat 0,04
- Agar 14,0
- pH: 5,7 +/- 0,2 bei 25°C

Geräte und Reagentien:
- Autoclav Certoclav, CertoClav Sterilizer GmbH
- Petrischalen (Plastik), steril,Schale 94,16, Greiner Bio-One GmbH
- Waage PG5002-S Delta Range, Mettler Toledo GmbH

Durchführung
Nach Herstellerangaben wurden 68,2 g des Trockenmediums in 1000 ml destilliertem Wasser suspendiert und in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Das MRS-Medium wurde bei 121°C für 15 min autoklaviert, im vorgeheizten Wasserbad auf ca. 50°C abgekühlt und im Sterilbereich des Bunsenbrenners in die vorbereiteten Petrischalen gegossen (15-20ml/Platte)

MRS-Bouillon

Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Art.Nr.1.10661

Zusammensetzung (g/l)

- Pepton aus Casein 10,0
- Fleischextrakt 10,0
- Hefeextrakt 4,0
- D(+)-Glucose 20,0
- di-Kaliumhydrogenphosphat 2,0
- Tween 80 1,0
- di-Ammoniumhydrogencitrat 2,0
- Natriumacetat 5,0
- Magnesiumsulfat 0,2
- Mangansulfate 0,04
- pH: 5,7 +/- 0,2

Geräte und Reagentien:

- Autoclav Certoclav, CertoClav Sterilizer GmbH
- Wasserbad D8, Haake
- Waage PG5002-S Delta Range, Mettler Toledo GmbH

Durchführung

Nach Herstellerangaben wurden 52,2 g des Trockenmediums in 1000 ml destilliertem Wasser suspendiert, gelöst und, je nach Verwendung, in der Glasflasche oder nach Aufteilung mittels eines Dispensers auf Glaseprouvetten (für die Anzucht der Referenzstämme), bei 121°C für 15min autoklaviert.

3.1.2. Semiquantitative Keimzahlbestimmung

Die Abstriche der Probandinnen wurden für die semiquantitaive Keimzahlbestimmung in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung suspendiert.

Für frühere Proben wurden insgesamt 4 dezimale Verdünnungen hergestellt, im Verlauf der weiteren Arbeit hat sich jedoch die Erweiterung auf 5 bzw. 7 dezimale Verdünnungsstufen als vorteilhaft erwiesen, da dadurch, speziell für hohe Keimzahlen, eine präzisere Bestimmung möglich war.

4 dezimale Verdünnungsstufen: 1-13, 14/1b, 14/1c, 14/2b, 14/2c, 18/1b, 18/2b, 18/1c, 18/2c, 19/1b, 19/1c

5 dezimale Verdünnungsstufen: 14/3b, 14/3c, 18/3b, 18/3c, 19/2b, 19/3b, 19/2c, 19/3c, 20/1b, 20/2b, 20/1c, 20/2c, 21/1b, 21/1c 22/1b, 22/1c

7 dezimale Verdünnungsstufen: 20/3b, 20/3c, 21/2b, 21/3b, 21/2c, 21/3c,22/2b, 22/3b, 22/2c, 22/3c, 23-50

Eine definierte Menge (100µl) der Verdünnung wurde auf eine MRS-Agarplatte, mittels Spateltechnik aufgebracht. Nach der Inkubation für 48h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen wurde die Anzahl der kolonie-bildenden Einheiten (KBE) gezählt bzw. eingeschätzt und auf 1 ml Flüssigkeit bezogen. Die Keimzahl wird in der Dimension KBE/ml angegeben.

Geräte und Reagenzien

- Kolbenhubpipetten, Fa.GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH
- Sterile Einwegspatel, L-form, VWR International,Vienna Austria
- Vortex MS 2 Minishaker, IKA GmbH & Co. KG
- Anaerobierschränke: WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland und Fa.Scholzen, Kriens, Schweiz

- **Phosphat gepufferte Kochsalzlösung**
  Dulbecco `A´ Tabletten BR0014, Hampshire**,** United Kingdom
  Zusammensetzung (g/l)
  - Natriumchlorid 8
  - Kaliumchlorid 0.2
  - Dinatriumhydrogenphosphat 1.15
  - Kaliumdihydrogenphosphat 0.2
  - pH: 7,3

Durchführung:

Die Tupfer mit den Abstrichen der Probandinnen wurden in jeweils 1 ml PBS suspendiert, in dem sie für 1 min schnell hin- und herbewegt wurden, um das daran haftende Zellmaterial zu lösen. Diese Verdünnung wurde als erste dezimale Verdünnungsstufe bezeichnet und für 20 Sekunden (s) auf höchster Stufe gemischt, um eine effektive Suspension zu gewährleisten. 100 µl der ersten dezimalen Verdünnungsstufe wurden anschließend in 900 µl PBS, die in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt wurde, pippetiert. Auf diese Weise wurden von jeder Probe vier, fünf oder sieben Verdünnungsstufen hergestellt.

100 µl, jeder dieser dezimalen Verdünnungsstufen, wurden auf vorbereitete MRS-Agarplatten, mittels Einwegspatel verteilt. Die Inkubation der Kulturplatten erfolgte anschließend für 48h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen. Danach wurden die kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt.

Anschließend wurde bei 12.000 min^{-1} für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbleibenden 800 µl der ersten dezimalen Verdünnungsstufe wurde bei 12.000 min^{-1} für 3 min zentrifugiert der Überstand verworfen und die Biomasse bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren. (KRONDORFER, 2008; JANITSCHEK, 2010)

3.1.3. Anlegen von Glycerinstock-Kulturen

Für mögliche, weiterführende Analysen wurden ausgewählte Einzelkolonien der Kulturplatten durch Einfrieren konserviert. Einzelkolonien der auszählbaren Kulturplatten (10-300 Kolonien) wurden ausgewählt und in jeweils 1 ml MRS-Bouillon unter Zugabe vom 200 µl Glycerin tiefgefroren. Erschienen die Einzelkolonien der Kulturplatten homogen, wurden fünf - im Falle heterogener Einzelkolonien - zehn ausgewählt.

Geräte und Reagenzien

- Glycerin 87%, Applichem, Art.Nr. A0970.100

Durchführung:

Je 1 ml MRS-Bouillon wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Die ausgewählten Einzelkolonien wurden mittels Einweg-Impfösen abgenommen und in die dafür vorgesehenen Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert. Anschließend wurden 200 µl Glycerin zugesetzt, für 10s auf höchster Stufe gemischt und sofort bei -80°C tiefgefroren.

3.1.4. Referenzstämme für Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese

Für die Denaturierende Gradienten Gel-Elektrophorese wurden Referenzstämme aus bestehenden Glycerinstock–Kulturen verschiedener Quellen gezüchtet (siehe Tab.3-1)
Zellmaterial des Glycerinstocks diente zur Anzucht einer Übernachtkultur. Anschließend wurde, mittels fraktionierten Ausstrichs, Zellmaterial der Übernachtkultur vereinzelt. Eine dieser Kolonien diente zur Anzucht einer neuen Übernachtkultur. Danach wurden die Zellen geerntet und gewaschen.

Tab. 3-1: Referenzstämme für DGGE

Code	**Genus**	***Species***	**Stammbezeichnung**
Lb 3	*Lactobacillus*	*gasseri*	DSM 20243, ATCC 33323
Lb 5	*Lactobacillus*	*johnsonii*	LMG 9436
Lb 6	*Lactobacillus*	*crispatus*	DSM 20584, ATCC 33820
Lb 23	*Lactobacillus*	*plantarum*	DSM 20174, ATCC 14917
Lb 99	*Lactobacillus*	*jensenii*	DSM 20557, ATCC 25258
Lb 192	*Lactobacillus*	*paracasei*	LMG 13087
Lb 197	*Lactobacillus*	*rhamnosus*	LMG 6400
Lb 257	*Lactobacillus*	*iners*	LMG 19914

Durchführung

Mit einer sterilen Einweg-Impföse wurde etwas Material der tiefgefrorenen Glycerinsstock-Kultur abgekratzt und in die dafür vorgesehenen 2 ml MRS-Bouillon transferiert. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen für 24h bei 37°C. Mittels fraktionierten Ausstrichs wurden die Kolonien vereinzelt. Die Inkubation erfolgte erneut unter anaeroben Bedingungen für 48h bei 37°C. Eine dieser Einzelkulturen diente zur Anzucht einer neuen Übernachtkultur in 10 ml MRS-Bouillon. Nach der anaeroben Inkubation für 24h bei 37°C wurden 3 Aliquote von jeweils 1,5 ml entnommen, bei 8.000 min^{-1} und 4 °C für 6 min zentrifugiert. Nachdem Verwerfen des Überstandes wurde die Biomasse im ersten Waschschritt mit 900 µl 0,9 % NaCl-Lösung, im Zweiten mit 900 µl EDTA (50 mM, pH 8) behandelt. Die Zentrifugation erfolgte unter den gleichen Bedingungen, beide Überstände wurden verworfen. Die so gewonnene Biomasse wurde bei -20 °C tiefgefroren.
[KRONDORFER, 2008]

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. DNA Isolierung

Die Isolierung der DNA stellt den ersten der molekularbiologischen Arbeitsschritte dar. Weitere Analysen wurden mittels verschiedenen PCR-Reaktionen, gefolgt von der Analyse mittels DGGE, durchgeführt. Jede der PCR-Reaktionen wurde qualitativ mittels Agarose-Gelelektrophorese auf Funktion und etwaige Kontamination überprüft. (KRONDORFER, 2008; JANITSCHEK 2010)

Durchführung:

Isolieren der DNA der Referenzstämme

Die Isolierung der Referenzstämme für die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese erfolgte mittels des ArchivePure DNA Yeast and Gram-positive Kit von 5PRIME.

Der ArchivePure DNA Yeast and Gram-positive Kit von 5PRIME wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

Inhalt

- Cell Suspension Solution
- Lytic Enzyme Solution
- Cell Lysis Solution
- RNase A Solution
- Protein Precipitation Solution
- DNA Hydration Solution

Geräte und Reagentien

- Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Vortex MS 2 Minishaker, IKA GmbH & Co. KG
- Heizblock QBD4, Grant Ltd., UK
- Kolbenhubpipetten Pipetman, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH
- Isopropanol, Roth GmbH & Co. KG
- 70 % Ethanol, Roth GmbH & Co. KG

Durchführung

Das Pellet wurde in 300 µl Cell Suspension Solution mittels auf- und abpipettieren suspendiert. Die Suspension wurde anschließend mit 1,5 µl Lytic Enzyme Solution versetzt und durch 25-maliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Um die Zellwand abzubauen, wurde die Suspension für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 12.000 min^{-1} für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Kolbenhubpipette abgezogen und verworfen. Das Pellet wurde nun mit 300 µl Cell Lysis Solution versetzt und erneut durch mehrmaliges auf- und abpipettieren suspendiert. Dem Lysat wurden 1,5 µl RNase A Solution hinzugefügt und die Suspension nach erneutem 25-maligen Invertieren, für 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur durch kurze Inkubation bei 4°C. Im Anschluss wurde das Zell-Lysat mit 100 µl Protein Precipitation Solution versetzt und für 20 s bei höchster Geschwindigkeit gemischt. Die Proben wurden nun bei 12.000 min^{-1} für 3 min zentrifugiert. Das präzipitiertes Protein zeigt sich dabei als weißes Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. In einem neuen Eppendorfgefäß wurden 300 µl Isopropanol vorgelegt und der, die DNA enthaltende Überstand, wurde vorsichtig abgezogen und überführt. Die Proben wurden nach 50-maligem Invertieren für 1 min bei 12.000 min^{-1} zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Reaktionsgefäß auf sauberem Papier abgetropft. Anschließend wurde das Pellet durch Zugabe von 300 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Reaktionsgefäß wurde danach mehrmals invertiert, erneut bei 12.000 min^{-1} zentrifugiert, der Überstand verworfen, und anschließend auf sauberem Papier abgetropft und für 10-15 min luftgetrocknet. Zuletzt wurden 100 µl DNA Hydration Solution zugefügt, kurz gemischt und anschließend für 1 h bei 65 °C inkubiert. Die Rehydrierung der DNA erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die isolierte DNA bis zur weiteren Verwendung, bei -20 °C tiefgefroren. (KRONDORFER, 2008; JANITSCHEK, 2010)

3.2.2. Isolieren der DNA der Proben

Die Isolierung der DNA der Abstriche der Probandinnen erfolgte mittels des Genomic DNA Isolation Kit for Bacteria Nexttec™ cleanColumns von Nexttec da Voruntersuchungen eine höhere DNA-Ausbeute bei der Anwendung dieses Kits gezeigt haben.

Der Genomic DNA Isolation Kit for Bacteria Nexttec™ cleanColumns von Nexttec wurde mit leichten Modifikationen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Inhalt

- Nexttec™ cleanColumns
- Waste collection tubes
- DNA collection tubes
- Prep Buffer
- Buffer B1
- Buffer B2
- Buffer B3
- RNase A
- Lysozyme

Geräte und Reagentien

- Mutanolysin, 10U/µl
- Ultra High Quality Water
- Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Vortex MS 2 Minishaker, IKA GmbH & Co. KG
- Thermomixer Compfort, Eppendorf AG
- Eppendorf Gefäße, Eppendorf AG
- Kolbenhubpipetten Pipetman, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH

Durchführung

Vor der DNA Isolierung wurden die Nexttec™ cleanColumns in die Waste collection tubes gesteckt und equilibriert. Dazu wurden 350 µl Prep Buffer in die Nexttec™ cleanColumns pipettiert, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei 350xg für 1 min zentrifugiert. DieNexttec™ cleanColumns wurden in die dafür vorgesehenen DNA collection tubes und die Waste collection tubes verworfen.

- Vorbereitung von Lysis Buffer LB 1
  90, 0 µl Buffer B1
  10, 0 µl Lysozyme
  20, 0 µl RNase A
  2,5 µl Mutanolysin
- Vorbereitung von Lysis Buffer LB 2
  2, 5 µl Buffer B2
  87, 5 µl UHQ-Water
  10,0 µl Buffer B3

Das Pellet wurde in 125,5 µl LB 1 Buffer durch mehrmaliges auf- und abpipettieren suspendiert und anschließend für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit gemischt. Die Suspension wurde anschließend bei 60°C und 1.200 min^{-1} für 25 min auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 100 µl LB 2 Buffer versetzt, erneut für 20 s bei höchster Geschwindigkeit

gemischt und für weitere 30 min bei 60°C und 1.200 min^{-1} auf dem Thermomixer inkubiert. Das Lysat wurde nun für 3 min bei 10.000 min^{-1} zentrifugiert, um etwaige Reste der Zellmembran zu pelletieren. 120 µl des Lysats wurden auf die equilibrierten Nexttec™ cleanColumns pipettiert und für 3 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 700g. Die isolierte DNA wurde in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die 1985 von Kary Mulis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion ist eine der wichtigsten Errungenschaften der Molekularbiologie. Sie ist eine in-vitro Methode zur DNA-Amplifizierung. Durch den Einsatz gezielt ausgewählter Primer können bestimmte DNA-Abschnitte mittels dieser Methode innerhalb weniger Stunden millionenfach vervielfältigt werden. (BARKER, 2006).

Gattungsspezifische PCR

Sowohl die isolierte DNA der Referenzstämme als auch der Proben wurden mittels *Lactobacillus*-spezifischen Primern für die folgende DGGE-Analyse amplifiziert. Das Ziel dieser Gattungsspezifischen PCR ist eine ausgewählte Sequenz der 16S rRNA, die die kleine Untereinheit des bakteriellen Ribosoms codiert. Die bakterielle 16S rRNA besteht sowohl aus hochkonservierten Bereichen, wie aus neun variablen Regionen (V1-V9). Die variablen Regionen V2 und V3 sind hypervariabel und anhand dieser kann zwischen verschiedenen Lactobacillus-Gattungen differenziert werden. Für die DGGE, wurde der reverse Primer, des Lac1-f - Lac2-r Primersystems mit einer 40 bp langen GC-Klammer modifiziert, um die vollständige Denaturierung der DNA während der DGGE zu verhindern. Für jede PCR wurde eine Positiv- und eine Negativkontrollprobe mitgeführt. Die Positivprobe wurde mit 1 µl DNA des Lactobacillenstammes *L. acidophilus* (Lb180), durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde 1 µl UHQ-Wasser verwendet. (WALTER et al., 2001)

PCR für Sequenzierung

Die isolierte DNA der ausgeschnittenen DGGE-Banden wurden ebenfalls mit dem Lactobacillus-spezifischen Primersystem Lac1-f - Lac2-r durchgeführt. Für jede PCR wurde eine Positiv- und eine Negativkontrollprobe mitgeführt. Die Positivprobe wurde mit 1 µl DNA des Lactobacillenstammes L. acidophilus Lb180, durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde 1 µl UHQ-Wasser verwendet. (WALTER et al., 2001)

Gattungsspezifische Enterokokken PCR

Da Enterokokken, ebenso wie Lactobacillen auf MRS-Agar wachsen, wurde der Vollständigkeit halber jede Probe ebenfalls auf Enterokokken untersucht. Die Durchführung dieser PCR erfolgte mit dem Enterokokkenspezifischen Primersystem Espp-1 - Espp-2. Für jede PCR wurde eine Positiv- und eine Negativkontrollprobe mitgeführt. Die Positivprobe wurde mit 1 µl DNA des Enterokokken Stammes *Enterococcus faecalis* (En4), durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde 1µl UHQ-Wasser verwendet. (RINTILLÄ, 2004)

Geräte

- Lamina, Captair Bio, Erlab Group
- Thermocycler „Mastercycler gradient“, Eppendorf AG
- Thermocycler „Mastercycler“, Eppendorf AG
- Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Vortex MS 2 Minishaker, IKA GmbH & Co. KG
- Kolbenhubpipetten, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH
- Latexhandschuhe, VWR International GmbH

Reagentien

- 10x PCR-Buffer (Dynazyme) F-511, MWG-Biotech AG
- Dynazyme II DNA Polymerase F-501L, 2 U/µl, Finnzymes Oy, Espoo, Finland
- dATP-Solution, 100 mM A2079, AppliChem GmbH
- dCTP-Solution, 100 mM A2080, AppliChem GmbH
- dGTP- Solution, 100 mM A2081, AppliChem GmbH
- dTTP- Solution, 100 mM A2082, AppliChem GmbH
- Primer, Eurofins MWG/Operon

Lösungen

- Mastermix MS
  7500 µl steriles UHQ-Wasser
  1000 µl 10x PCR-Puffer
  200 µl dNTP-Mix
  100 µl Dynazyme II DNA Polymerase (2U/µl)

Die Reagentien wurden gemischt und bis zur weiteren Verwendung in Aliquoten zu je 1ml bei – 20°C aufbewahrt.

- Mastermix MM
  7400 µl steriles UHQ-Wasser
  1000 µl 10x PCR-Puffer
  200 µl dNTP-Mix
  200 µl Dynazyme II DNA Polymerase (2U/µl)

Die Reagentien wurden gemischt und bis zur weiteren Verwendung in Aliquoten zu je 1 ml auf – 20°C aufbewahrt.

- dNTP-Mix
  100 µl ATP, 100 mM
  100 µl CTP, 100 mM
  100 µl GTP, 100 mM
  100 µl TTP, 100 mM
  600 µl steriles UHQ-Wasser

- Primer-Lösung (10 pmol/µl)
  10 µl Primer Stocklösung (100 pmol/µl)
  90 µl steriles UHQ-Wasser

Durchführung

Für jede PCR wurde ein eigener Premix in einem gekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäß vorbereitet.

- Premix – Referenzstämme für DGGE
  22,0 µl Mastermix MS
  1, 0 µl Lac1-f
  1, 0 µl Lac2-r-GC

- Premix - DGGE
  22, 0 µl Mastermix MM
  1, 0 µl Lac1-f
  1, 0 µl Lac2-r-GC

- Premix - Sequenzierung
  22,0 µl Mastermix MM
  1,0 µl Lac1-f
  1,0 µl Lac2-r

- Premix - Enterokokken
  22,0 µl Mastermix MS
  1,0 µl forward Primer
  1,0 µl reverse Primer

Mögliche Pipettierfehler wurden berücksichtigt indem für jeweils 10 Ansätze ein zusätzliches Volumen kalkuliert wurde. Der Premix wurde kurz, bei maximal 10.000 min^{-1} gemischt und 24,0 µl pro Probe in ein gekühltes 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Danach wurde 1 µl der Proben-DNA hinzugefügt, nochmals bei maximal 10.000 min^{-1} gemischt um eine Schädigung der DNA auszuschließen. Die Reaktionsgefäße mit den PCR-Ansätzen wurden in den Thermocycler gestellt und die gewünschten Bedingungen programmiert. (KRONDORFER, 2008; JANITSCHEK, 2010)

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die Sequenzen der verwendeten Primersysteme für die Gattungsspezifische *Lactobacillus* und *Enterococccus* PCR sowie die Bedingungen Cycler Programme.

Tab. 3-2: Sequenzen der Primer für DGGE und Sequenzierung (Walter et. al. 2001)

Primer	Basensequenz 3'-5'	bp	Anealing-Temperatur	Literatur
Lac1-f	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	380	61°C	Walter et.al.; 2001
Lac2-r	ATT(CT)CACCGCTACACATG			

Tab. 3-3: PCR-Programm der in Tab. 3-2 verwendeten Primer für die Analyse der Proben mittels DGGE, 35 Zyklen (Walter et. al. 2001)

Schritt	Temperatur	Dauer	Literatur
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	Walter et.al.; 2001
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	61°C	40 s	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Tab. 3-4: PCR-Programm der in Tab. 3-2 verwendeten Primer der Referenzstämme für die Analyse mittels DGGE, 30 Zyklen (Walter et. al. 2001)

Schritt	Temperatur	Dauer	Literatur
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	Walter et.al.; 2001
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	61°C	40 s	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Tab. 3-5: PCR-Programm der in Tab. 3-2 verwendeten Primer für die Sequenzierung, 30 Zyklen (Walter et. al. 2001)

Schritt	Temperatur	Dauer	Literatur
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	Walter et.al.; 2001
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	61°C	40 s	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Tab. 3-6 Sequenzen der Primer für die Gattungsspezifische *Enterococcus* PCR (Rinttilä et. al. 2001)

Primer	Basensequenz 3'-5'	bp	Anealing-Temperatur	Literatur
Espp-1	CCCTTATTAGTTGCCATCATT	144	61°C	Rinttilä et al.; 2004
Espp-1	ACTCGTTGTACTTCCCATTGT			

Tab. 3-7: PCR-Programm der, in Tab. 3-6 verwendeten, Primer für die gattungsspezifische *Enterococcus* PCR, 35 Zyklen (Rinttilä et. al. 2001)

Schritt	Temperatur	Dauer	Literatur
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	Rinttilä et al.; 2004
Denaturierung	95°C	15 s	
Annealing	61°C	20 s	
Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	

3.2.4. Agarose Gelelektrophorese

Die Gelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Trennung von Nukleinsäuren aufgrund ihrer Größe. Die negativ geladenen Nukleinsäuren, wandern unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch eine Agarosematrix zu der positiv geladene Elektrode. Die aufgetrennten Nukleinsäuren werden durch Färbung des Gels mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie etwa Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. (BARKER, 2006)

Für alle Agarosegelelektrophoresegele wurde als DNA-Marker die in Abb. 3-1 dargestellte DNA Ladder 100 plus verwendet. (KRONDORFER, 2008; JANITSCHEK, 2010)

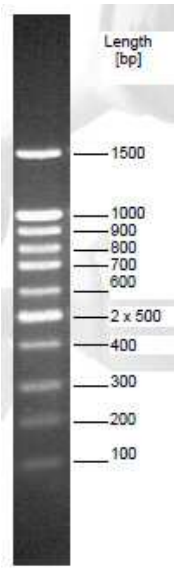

Abb. 3-1: DNA Ladder 100bp plus (AppliChem GmbH)

Geräte

- ORIGINS; Elchrom Scientific, Switzerland
- Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Vortex MS 2 Minishaker, IKA GmbH & Co. KG
- Kolbenhubpipetten, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH
- Waage 1207 MP, Sartorius AG
- ChemiImager 5500, Alpha Innotech Ltd., San Leandro, CA, USA
- Färbe- und Entfärbewannen

Reagentien

- Agarose (fur Gelelektrophorese) SeaKem LE Agarose 50002, Cambrex Corp., USA
- DNA ladder 100 bp plus A5216, AppliChem GmbH
- Borsaure A2940, AppliChem GmbH
- Bromphenolblau A4968, AppliChem GmbH
- Xylencyanol FF A4976, AppliChem GmbH
- EDTA-Lösung 0,5 M, pH 8 A3145, AppliChem GmbH
- Ficoll A2252, AppliChem GmbH
- Tris UltraPure A1086, AppliChem GmbH
- Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml), Art. Nr. 2218.2, Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Lösungen

- 50x TAE-Puffer
  242 g Tris
  57,5 ml „Eisessig“
  100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
  Auf 1000 ml mit glasdest. Wasser auffüllen, autoklavieren (121 °C, 15 min).

- 0,75x TAE-Puffer
  15 ml 50x TAE-Puffer
  985 ml glasdestilliertes Wasser

- 6x Gelladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 13% Ficoll)
  0, 025 g Bromphenolblau
  0,025 g Xylene Cyanol
  1,500 g Ficoll
  Mit 10 ml autoklaviertem UHQ-Wasser versetzen, bei Raumtemperatur lagern.

- 100 bp-DNA-Marker (0,083 µg/µl)
  50,0 µl Stock-Lösung mit
  450,0 µl sterilem UHQ-Wasser mischen,
  100,0 µl 6 x Gelladepuffer zugeben, vortexen.

- Färbelösung
  35 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
  350 ml destilliertes Wasser

Herstellung des Agarosegels

In eine zuvor autoklavierte Glasflasche wurde die erforderliche Menge Agarose steril eingewogen und die entsprechende Menge an 0,75x TAE hinzugefügt. (siehe Tab. 3-8)

Die Agaroselösung wurde anschließend in der Mikrowelle, unter mehrmaligem Schwenken, geschmolzen bis die Lösung vollkommen klar war. Anschließend wurde die Agarose im Wasserbad für 15 min auf 50 °C temperiert. Mittels eines Gelgießstandes wurde die flüssige Agarose in den vorbereiteten planar ausgerichteten Gelträger gegossen. Die Kämme wurden vorsichtig eingesetzt und das Gel bei Raumtemperatur für 30-60 min polymerisiert. Währenddessen wurde die Elektrophoresekammer vorbereitet. Die erforderliche Menge des Laufpuffers (2l) wurde vorbereitet und nach dem Einfüllen wurden Kühlung und Pumpe eingeschaltet. Zuletzt wurde der Gelträger in der Elektrophoresekammer platziert und die Kämme entfernt. Während des Auftragens der Proben wurde die Pumpe ausgeschaltet.

Tab. 3-8: Agarose-Einwaage für 2%ige Gele

Größe des Gels	**Agarose [g]**	**0,75x TAE Puffer [ml]**
klein	0,7	40
groß	1,4	70

Elektrophorese

Die Proben wurden für die Elektrophorese vorbereitet, indem 4 Teile des PCR-Produkts mit 1 Teil des Ladepuffers versetzt, durch auf- und abpipettieren gemischt und kurz zentrifugiert wurden. Anschließend wurden 5 µl der Proben und 4 µl der 100bp Ladder in die Taschen des Gels pipettiert.

Nach dem Auftragen wurde die Elektrophoresekammer geschlossen, die Stromversorgung eingeschaltet und die gewünschte Spannung und Dauer eingestellt. Die Laufzeit jedes Gels betrug bei einer Spannung von 80V 50 min.

Färben des Gels

Der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) wird nach der GHS-Verordnung als sehr toxisch eingestuft. Ethidiumbromid wirkt sowohl kanzerogen als auch mutagen (Gefahrensätze: R22-26-68). Der Umgang damit erfordert deshalb besondere Sorgfalt. Jeder Arbeitsschritt wurde in einem eigens dafür vorgesehenen Raum unter Verwendung von Nitrilhandschuhen durchgeführt, um eine Kontamination von Personen oder anderen Räume auszuschließen.

Das Gel wurde, nach Ablauf der Laufzeit, vorsichtig vom Gelträger gelöst und in einer Färbewanne mit 350 ml einer 1:100 Verdünnung, Ethidiumbromid mit destilliertem Wasser, für 30 min gefärbt.

Nach Abschluss des Färbevorgangs, wurde die Färbelösung in dafür vorgesehenen Behältnissen gelagert, bis sie über eine Aktivkohle-Säule adsorbiert wurde.

Entfärben

Mittels 300 ml des Laufpuffers der für die Elektrophorese verwendet wurde, wurde anschließend das Gel für die Dauer von 15 min entfärbt.

Auch diese Lösung wurde in dafür vorgesehenen Behältnissen zwischengelagert und ebenfalls über Aktivkohle gereinigt.

Fotografieren

Alle Elektrophoresegele wurden im ChemiImager, mithilfe der dazugehörenden Software unter UV-Licht digital fotografiert. Dazu wurden die Gele vorsichtig auf den UV-Transilluminator transferiert und fotografiert. (KRONDORFER, 2008; JANITSCHEK, 2010)

3.2.5. DGGE– Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese

Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese ist eine molekularbiologische Fingerprintmethode, die die Trennung von PCR-Amplicons gleicher Größe aufgrund differierender Sequenzen ermöglicht. Die PCR-DGGE wurde 1993 von Muyzer et al. in der Molekularbiologie etabliert. Es handelt sich hierbei um eine effektive Methode der Molekularbiologie um rasche Ergebnisse bei der Analyse der Diversität in bakteriellen Gemeinschaften zu erzielen. DGGE Analysen werden ebenfalls in der Medizin zur Detektion von Mutationen, beispielsweise Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's), genutzt.

Die Parameter der Denaturierung, werden durch die Kombination einer konstanten Temperatur und denaturierenden Agens determiniert. (ANUKAM und REID, 2007)

Die durch die Migration im Acrylamid-Elektrophoresegel linear ansteigende Exposition zu diesen denaturierender Agens, setzt die doppelsträngigen DNA-Fragmente einer steigenden Denaturierung aus, die an den sogenannten "melting domains" beginnt. Die Schmelztemperatur dieser Domänen ist sequenzspezifisch und beruht auf der unterschiedlichen Stabilität der G-C und A-T Basenpaaren, die durch die Anzahl ihrer Wasserstoffbrückenbindungen determiniert wird. DNA Fragmente mit einem höheren GC-Anteil, sind im Gegensatz zu solchen mit Niedrigen stabiler. Es bilden sich unterschiedlich verzweigte Moleküle, deren Elektrophoresemobilität verringert ist. Um ein komplettes Aufschmelzen der DNA zu verhindern, wird an einen der beiden PCR-Primer ein 30-40 bp lange GC-Klammer angehängt. Die Visualisierung erfolgt ebenfalls mit fluoriszierenden Farbstoffen wie Ethidiumbromid.(ERCOLINI, 2004; MUYZER und SMALLA, 1998)

Geräte und Materialien

- DGGE-Apparatur „DCode System": Gelgießstand, 4 Glasplatten, 4 Abstandhalter, 4 Randklemmen, 2 Probenkämme, Puffertank, Kern, Haube,
- Power Supply „Power Pac"; Bio-Rad GesmbH
- Gradientenmischer Model 485, Bio-Rad GesmbH
- 2 Magnetrührer „Big Squid", IKA GmbH & Co. KG
- Kolbenhubpipetten, diverse Größen, Fa. GILSON
- Pipettenspitzen, Biozym GmbH

- Sterilin-Gefäße, 30 ml, Greiner Bio-One GmbH
- GPA5202,Sartorius AG Göttingen,Germany
- Waage 1207 MP, Sartorius AG
- Filterpapier, Plastikfolie
- ChemiImager 5500, Alpha Innotech Ltd., San Leandro, CA, USA
- Bind-ET, AL Labortechnik, Austria

Reagentien

- 70 % Ethanol, Roth GmbH & Co. KG
- Harnstoff, Serva GmbH, Nr. 24524
- Formamid, Serva GmbH, Nr. 39604
- Ammoniumpersulfat, Serva GmbH, Nr. 13375
- TEMED (N, N, N, N-Tetramethylethylendiamid), Serva GmbH, Nr. 35930
- 40 % Acrylamid/Bis, Serva GmbH, Nr. 10681
- Glycerin 86 %, Roth GmbH & Co. KG, Nr. 7533.1
- Bromphenolblau A4968, AppliChem GmbH
- Xylene Cyanol FF A4976, AppliChem GmbH
- EDTA 0,5 M, pH 8
- Tris A1086, AppliChem GmbH
- Eisessig, Roth GmbH & Co. KG
- Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml), Art. Nr. 2218.2, Roth GmbH & Co. KG

Lösungen

- PER-Lösung
  48 mg Ammoniumpersulfat
  480 µl UHQ-Wasser

- 0 % Denaturierungslösung
  20 ml 40 % Acrylamid/Bis
  2 ml 50x TAE-Puffer
  78 ml UHQ-Wasser
  Bis zur Verwendung bei -4°C lagern.

- 100 % Denaturierungslösung
  42 g Harnstoff
  20 ml 40 % Acrylamid/Bis
  2 ml 50x TAE-Puffer
  40 ml Formamid
  Mit UHQ-Wasser bis zur 100 ml-Marke auffüllen. Bis zur Verwendung bei -4°C lagern.

- 50x TAE-Puffer
  242 g Tris
  57,1 ml Eisessig
  100 ml EDTA (0,5 M, pH 8)
  Auf 1000 ml mit UHQ-Wasser auffüllen, autoklavieren (121 °C, 15 min).

- 1x TAE-Puffer
  20 ml 50x TAE, gelöst in 980 ml UHQ-Wasser

- Loading Dye
  250 µl Bromphenolblau (2 %)
  250 µl Xylene Cyanol (2 %)
  8 ml Glycerin (86 %)
  1,5 ml UHQ-Wasser

Durchführung

Die 100 %-Denaturierungslosung wurde ca. 2 Stunden vor Gebrauch bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer plaziert, um die stark ausgebildeten Harnstoff-Kristalle zu lösen.
Vor dem Zusammenbau der Gelträger wurden die 4 Glasplatten mit 70 % Ethanol gereinigt, mittels der Klammern zusammengebaut und im Gelgießstand fixiert. Das System wurde vor Verwendung auf Dichtheit geprüft, indem destilliertes Wasser zwischen die Glasplatten gefüllt wurde. anschließend wurde das System mit Filterpapier getrocknet. Nach dem Vorbereiten der PER-Lösung und der Bereitstellung der 0%-Lösung wurden die Gradienten-Gele gegossen. Alle DGGE-Gele wurden mit einem 35-55 % Gradienten gegossen. Für die Zusammensetzung siehe Tabelle 3-9.

Tab. 3-9: Zusammensetzung der Gradientenlösung für DGGE

Lösung	0% - Lösung (ml)	100% - Denaturierungslösung (ml)
35% Gradientenlösung (L)	10,4	5,6
55% Gradientenlösung (H)	7,2	8,8

Das Volumen der 0 %-Lösung muss in die Sterilingefäße vorgelegt werden, da sonst ein Niederschlag gebildet wird. Beiden Gradientenlösungen wurde kurz vor dem Gießen 120 µl PER-Lösung und 12 µl TEMED hinzugefügt um das Polymerisieren des Gels zu gewährleisten. Die Sterilin Gefäße wurden verschlossen und vorsichtig geschwenkt um die Flüssigkeiten zu vermischen. Beide Gradientenlösungen wurden mittels Spritzen aufgezogen und diese in das Gradientenmisch Rad eingesetzt. Mittels Plastikschläuchen wurde das System verbunden und das Gel gegossen. Nach dem Gießen wurde der Probenkamm ins Gel eingesetzt. Die Spritzen und

Schläuche wurden sofort mit destilliertem Wasser gereinigt um eine Verstopfung durch polymerisierte Gelreste auszuschließen. Das Polymerisieren des Gel benötigt 2-3 Stunden.
Etwa eine Stunde vor Ende der Polymerisation wurden 6 Liter 1x TAE-Puffer hergestellt, der Tank befüllt und ein Magnetrührkern im Tank plaziert. Der Tank wurde über einem Magnetrührer platziert und bei geschlossenem Deckel mittels Heizrührstabs auf 60 °C aufgeheizt.
Die fertig polymerisierten Gele wurden, nach der vorsichtigen Entfernung der Kämme, in die zuvor mit destilliertem Wasser benetzte Gelhalterung eingesetzt. Die so entstehende Kammer zwischen den Gelen wurde mit 1x TAE Puffer gefüllt und ebenfalls auf Dichtheit kontrolliert. Jede einzelne Geltasche wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren, zuerst mit dem Puffer und anschließend nochmals mit Luft, gespült. Anschließend wurde das System in den Tank gehängt. Vor dem Auftragen der Proben wurde der Pufferstand im Tank und in der Kammer kontrolliert und gegebenenfalls aufgefüllt. Das System wurde wieder auf 60 °C aufgeheizt.
Die Proben wurden für die DGGE vorbereitet, indem 16 µl PCR-Produkt im Verhältnis 1:1 mit Ladepuffer versetzt, durch auf- und abpipettieren gemischt und kurz zentrifugiert wurden. Nach Erreichen der 60°C wurden die Proben in die Geltasche aufgetragen. Nach dem Schließen des Systems wurde der Spannungsversorger angeschlossen.
Einstellung für die DGGE: 70 Volt; Laufzeit: 960 Minuten (16h).
Nach Ablauf der Laufzeit wurde die Apparatur ausgeschalten, zerlegt und die Gele nach Markierung der linken oberen Ecke, vorsichtig auf einer Transportfolie plaziert. Die Markierung bezeichnet die Ecke an der die letzte Probe eines Gels aufgetragen wurde. Die Gele wurden in 600 ml, mit 60 µl Ethidiumbromid versetzten, glasdestilliertem Wasser, versetzt für 45 min, analog den Agarosegelen gefärbt und für 15 min in 600 ml des Laufpuffers entfärbt. Die Gele wurden ebenso wie Agarosegele unter UV-Licht digital fotografiert. (JANITSCHEK, 2010; KRONDORFER, 2008)

Ausschneiden der Banden

Gerate und Reagenzien

- 1 UV-Schutzschild ANSI Z87, Nalgene Corp., Rochester, NY, USA
- ChemiImager 5500, Alpha Innotech Ltd., San Leandro, CA, USA
- 10x PCR-Puffer F-511, Finnzymes Oy, Espoo, Finnland

Durchführung

Banden von Interesse wurden unter Beachtung der notwendigen Sicherheitvorkehrungen im Umgang mit UV-Licht, einzeln mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein eigenes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden mit 100 µl 1x PCR-Puffer gespült und anschließend in 100 µl 1x PCR-Puffer bei 4°C über Nacht inkubiert, um das Ausdiffundieren der DNA aus dem Gel zu ermöglichen. Am folgenden Tag wurde eine PCR mit dieser DNA durchgefuhrt. Verwendete Primer siehe Tabelle 3-2. (JANITSCHEK, 2010; KRONDORFER, 2008)

3.2.6. Reinigung für Sequenzierung

Die Aufreinigung der PCR Produkte erfolgte mittels PCRExtract Mini Kit von 5PRIME. Der PCRExtract Mini Kit von 5PRIME wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

Inhalt

- Mini Columns CB2, Collection Tubes 2 ml
- Puffer BL
- Puffer PD
- Puffer PW (Konzentrat, reines Ethanol wird zugegeben)
- Puffer PEB

Geräte

- Centrifuge 5417R, Eppendorf AG
- Ethanol (70 % und 96 %), Roth GmbH & Co. KG

Durchführung

Die PCRExtract Mini Columns CB2 wurden die dafür vorgesehenen 2 ml Collection Tube platziert und anschließend mit 500 µl BL Puffer durch Zentrifugation für 1 min bei 12.000 min^{-1}, equilibriert. Das Eluat wurde verworfen. 1 Teil des PCR Produktes wurde mit 5 Teilen PD Puffer gemischt auf die Mini Columns CB2 aufgetragen. Die Proben wurden anschließend für 2 min bei Raumtermperatur inkubiert um die DNA an die Säulenmatrix zu binden. Anschließend wurde für 1 min bei 12.000 min^{-1} zentrifugiert und das Eluat ebenfalls verworfen. Die auf der Säulenmatrix anheftende DNA wurde zuerst mit 700 µl PW Puffer und anschließend 500 µl PW Puffer. Beide Zentrifugationsschritte fanden bei selben Bedingungen statt (1 min bei 12.000 min^{-1}). Nach dem erneuten Verwerfen des Eluats wurde die Mini Column erneut bei 12.000 min^{-1} für 2 min zentrifugiert, um alle Reste des Puffers zu entfernen.

Anschließend wurden die Membranen der Mini Columns für einige Minuten mit offenen Deckeln an der Luft getrocknet. Die Mini Columns wurden anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert. Die DNA wurde durch Zugabe 50 µl PEB, Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 12000 min^{-1}, eluiert. (JANITSCHEK, 2010; KRONDORFER, 2008)

3.2.7. Sequenzierung

20 µl der gereinigten DNA sowie 15 µl des dazugehörigen Primers (2 pmol/µl) wurden zur Firma Eurofins MWG/Operon, Deutschland, zum Sequenzieren geschickt.

Unter http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi konnten die erhaltenen Sequenzen eingegeben werden.

Die Sequenzen wurden im Fastaformat über http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast mittels fogenden Einstellungen identifiziert: Database: Others; Optimize: Highly similar sequences (megablast).
Die Auswertung erfolgte unter folgenden Gesichtspunkten: Das Ergebnis mit der höchsten Prozent-Identität (% Identity) und dem niedrigsten E-Value wurde ausgewählt. Der E-Value gibt die Signifikanz des Ergebnisses an. Je niedriger der E-Value ist, desto größer ist die Signifikanz des Treffers. (KRONDORFER, 2008; JANITSCHEK, 2010)

3.2.8. Auswertung mittels Bionumerics:

Die Fotos der DGGE–Gele, die mittels des UV-Transilluminators erstellt wurden, wurden mittels der Software Bionumerics (Version 6.5. Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) analysiert. Dazu wurden die Gele normalisiert, die Banden markiert und beschriftet und um die sequenzierten Banden ergänzt. Anschließend wurden die Ergebnisse über die Software ausgewertet und Clusteranalysen durchgeführt.

Die Bandenmuster wurden mittels des “band matching tools” analysiert, wobei vordeffinierte Banden Klassen erstellt wurden. Diese wurden über Referenzstämme und zusätzliche Sequenzanalysen klassifiziert.

Für die Beschreibung der Ähnlichkeiten der Isolate wurde der Coeffizient Jaccard benützt. In Folge wurde ein Datensatz aufgrund des Mittelwerts der analysierten DGGE Bandenmuster auf Basis von binäen Daten (An- oder Abwesenheit von Banden) erstellt.

Für die Clusteranalysen wurde die “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean” (UPGMA, Sneath & Sokal, 1973) verwendet (1.0% Distanztoleranz, 0.5% Optimierung).

4. Ergebnisse

4.1. Mikrobiologische Ergebnisse

4.1.1. Semiquantitative Keimzahlbestimmung

Die Keimzahl der Lactobacillen der Abstriche wurden mittels Koch'schem Plattenverfahren quantitativ ermittelt. Die MRS-Agarplatten wurden nach dem Ausstreichen der verdünnten Proben für 48 Stunden bei 37°C anaerob inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien gezählt.

4 dezimale Verdünnungsstufen: 1-13, 14/1b, 14/1c, 14/2b, 14/2c, 18/1b, 18/2b, 18/1c, 18/2c, 19/1b, 19/1c

5 dezimale Verdünnungsstufen: 14/3b, 14/3c, 18/3b, 18/3c, 19/2b, 19/3b, 19/2c, 19/3c, 20/1b, 20/2b, 20/1c, 20/2c, 21/1b, 21/1c 22/1b, 22/1c

7 dezimale Verdünnungsstufen: 20/3b, 20/3c, 21/2b, 21/3b, 21/2c, 21/3c,22/2b, 22/3b, 22/2c, 22/3c, 23-50

In Tab. 4-1 sind die Ergebnisse der semiquantitativen Keimzahlbestimmung zusammengefasst.

Tab. 4-1: Ergebnisse der Semiquantitativen Keimzahlbestimmung (N.V. = Probe nicht vorhanden)

Probandin	Rectum			Vagina		
	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 0	Tag 14	Tag 28
1	N.V.	N.V.	N.V.	1,22E+07	4,29E+06	1,71E+03
2	2,26E+06	9,07E+04	N.V.	6,48E+06	1,00E+07	N.V.
3	3,21E+06	5,15E+06	1,30E+04	8,80E+06	1,36E+04	1,04E+03
4	1,50E+02	1,26E+04	6,40E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5	1,26E+07	7,50E+02	3,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	1,03E+07
6	1,40E+07	9,90E+03	1,32E+04	1,60E+02	3,36E+05	1,39E+05
7	3,44E+07	1,04E+03	N.V.	2,80E+05	0,00E+00	N.V.
8	4,06E+07	1,29E+03	N.V.	2,13E+05	9,34E+06	N.V.
9	4,50E+06	5,29E+06	2,67E+03	0,00E+00	1,69E+05	2,30E+03
10	5,20E+06	3,45E+02	8,05E+02	0,00E+00	9,05E+02	0,00E+00
11	0,00E+00	8,80E+03	1,92E+05	0,00E+00	9,80E+03	1,37E+05
12	0,00E+00	1,37E+06	2,22E+04	0,00E+00	1,12E+03	3,55E+03
13	4,00E+07	9,29E+05	5,32E+06	3,00E+06	7,70E+05	9,00E+01
14	2,68E+06	3,70E+02	6,21E+05	1,21E+05	5,07E+03	5,54E+05
18	1,01E+06	9,05E+02	4,00E+01	3,00E+06	1,09E+03	1,90E+02
19	1,12E+03	3,38E+07	5,19E+07	0,00E+00	7,17E+02	1,26E+07
20	3,77E+07	1,62E+03	3,54E+06	9,85E+03	1,41E+04	5,08E+06
21	0,00E+00	7,65E+05	7,32E+04	2,19E+05	8,10E+06	9,14E+04
22	1,04E+04	6,35E+04	3,66E+06	0,00E+00	0,00E+00	2,17E+07
23	9,95E+06	2,92E+08	1,31E+06	1,50E+07	4,80E+06	1,33E+04
24	2,39E+06	3,80E+02	4,03E+05	4,10E+04	3,35E+04	7,50E+04
25	1,39E+06	1,78E+06	3,70E+05	8,53E+02	2,47E+03	1,01E+03
26	6,20E+06	4,40E+07	1,84E+07	5,20E+06	4,85E+07	5,50E+07

Probandin	Rectum			Vagina		
	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 0	Tag 14	Tag 28
27	2,66E+06	2,60E+07	2,01E+05	1,44E+04	1,45E+04	4,70E+05
28	1,10E+02	1,59E+06	1,10E+07	1,71E+04	1,55E+05	2,68E+04
29	1,68E+08	1,40E+04	6,80E+06	1,11E+07	4,05E+06	2,85E+05
30	1,87E+06	1,63E+07	N.V.	0,00E+00	5,70E+06	N.V.
31	1,47E+08	1,34E+04	1,49E+05	6,30E+02	3,65E+02	1,65E+02
32	4,18E+06	4,95E+05	1,55E+07	4,18E+06	1,96E+06	3,70E+06
33	1,90E+07	1,22E+07	2,08E+05	2,00E+01	4,00E+01	0,00E+00
34	9,45E+04	5,30E+02	N.V.	1,43E+08	1,12E+06	N.V.
35	3,37E+04	4,70E+05	2,05E+04	2,36E+03	1,16E+07	9,75E+04
36	1,81E+03	1,11E+07	1,57E+06	1,11E+03	5,85E+05	1,16E+06
37	8,45E+04	1,05E+05	4,85E+05	2,10E+02	4,34E+04	1,51E+06
38	1,06E+04	1,03E+07	7,85E+07	1,49E+07	1,43E+08	4,80E+07
39	1,39E+04	4,05E+03	2,22E+04	5,05E+04	2,06E+05	3,62E+04
40	1,27E+05	0,00E+00	1,27E+06	4,08E+04	2,34E+05	8,15E+05
41	1,61E+06	8,65E+05	2,17E+06	1,94E+04	9,80E+05	7,70E+02
42	1,10E+06	1,25E+05	1,07E+07	1,20E+04	1,17E+03	8,20E+02
43	4,55E+04	3,25E+07	1,82E+06	1,71E+07	7,00E+04	1,02E+06
44	1,40E+07	3,04E+07	2,25E+07	1,35E+07	0,00E+00	1,01E+07
46	1,48E+07	5,05E+06	2,81E+05	1,37E+04	1,36E+04	3,85E+03
47	3,37E+03	6,65E+04	1,22E+05	1,00E+02	7,00E+01	1,08E+03
50	2,10E+07	1,05E+08	9,65E+07	1,56E+08	6,30E+08	8,00E+08

In den folgenden Abbildungen (Abb.4-1. bis Abb. 4-10) sind die Keimzahlen der bearbeiteten Proben grafisch dargestellt. Die folgenden Abstriche der Probandinnen sind nicht eingelangt und grafisch konnten grafisch nicht berücksichtigt werden.

Probandin 1: rektal-Tag 0,14,28; Probandin 2: rektal-Tag 28, vaginal-Tag 28;
Probandin 7: rektal-Tag 28, vaginal-Tag 28; Probandin 8: rektal-Tag 28, vaginal-Tag 28;
Probandin 30: rektal-Tag 28, vaginal-Tag 28; Probandin 34: rektal-Tag 28, vaginal-Tag 28;

Für alle anderen Abstriche, die in der grafischen Darstellung fehlen, konnte kein Wachstum bei der semiquantitativen Keimzahlbestimmung beobachtet werden.

Grafische Darstellung der rektalen und vaginalen Keimzahlen - Probandin 1-10

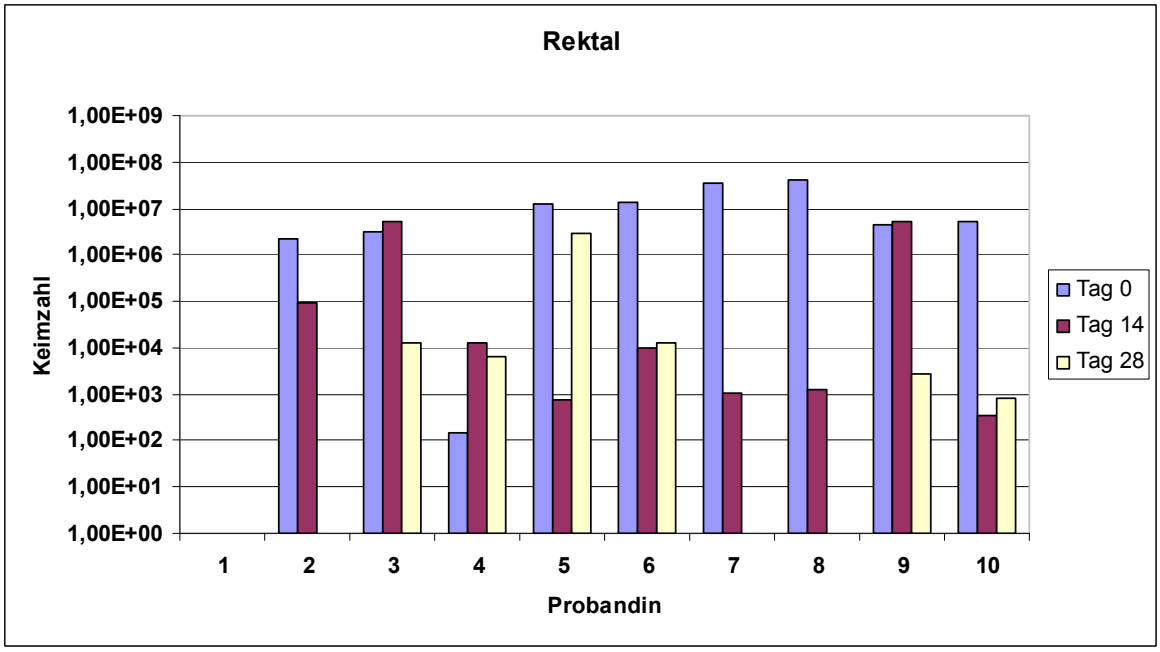

Abb. 4-1: Probandin 1-10, rektale Abstriche von Probandin 1 (Tag 0,14,28) und von Probandin 2,7,8 (Tag 28) nicht vorhanden.

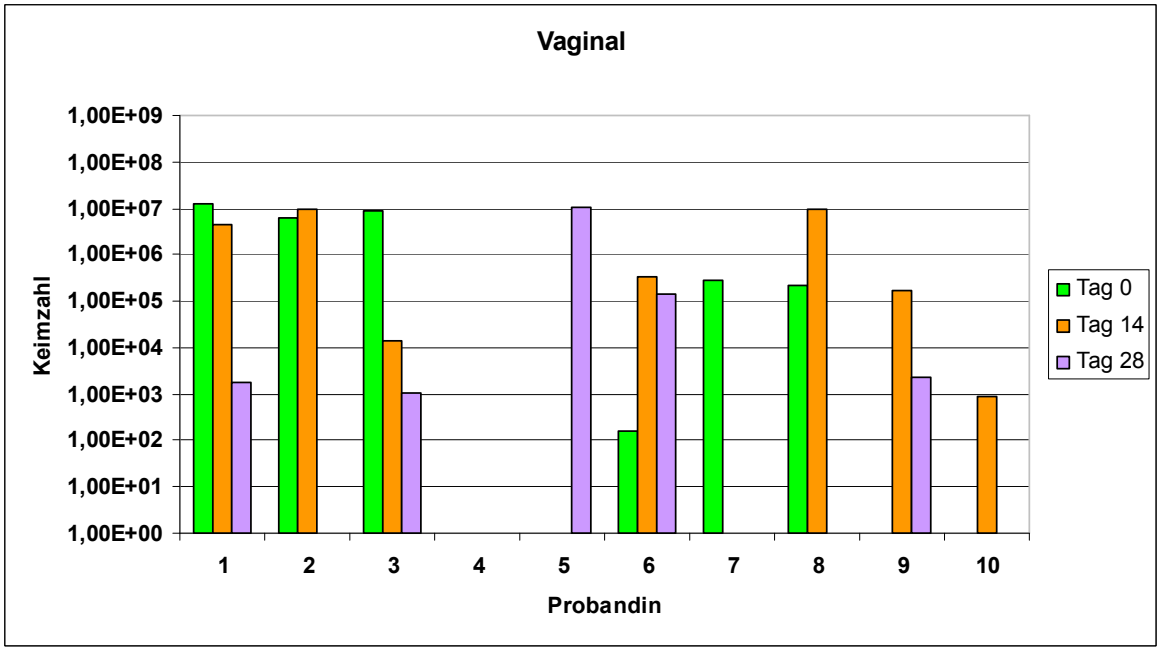

Abb. 4-2: Probandin 1-10, vaginale Abstriche von Probandin 2,7,8 (Tag 28) nicht vorhanden.

Grafische Darstellung der rektalen und vaginalen Keimzahlen - Probandin 11-23

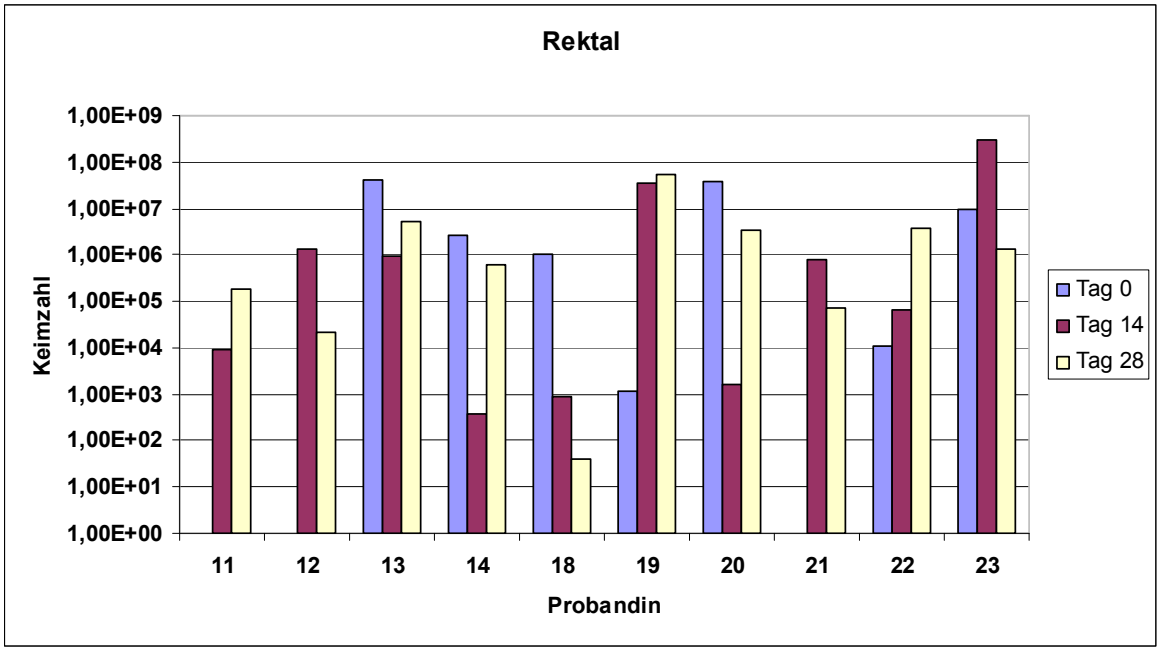

Abb. 4-3: Probandin 11-23

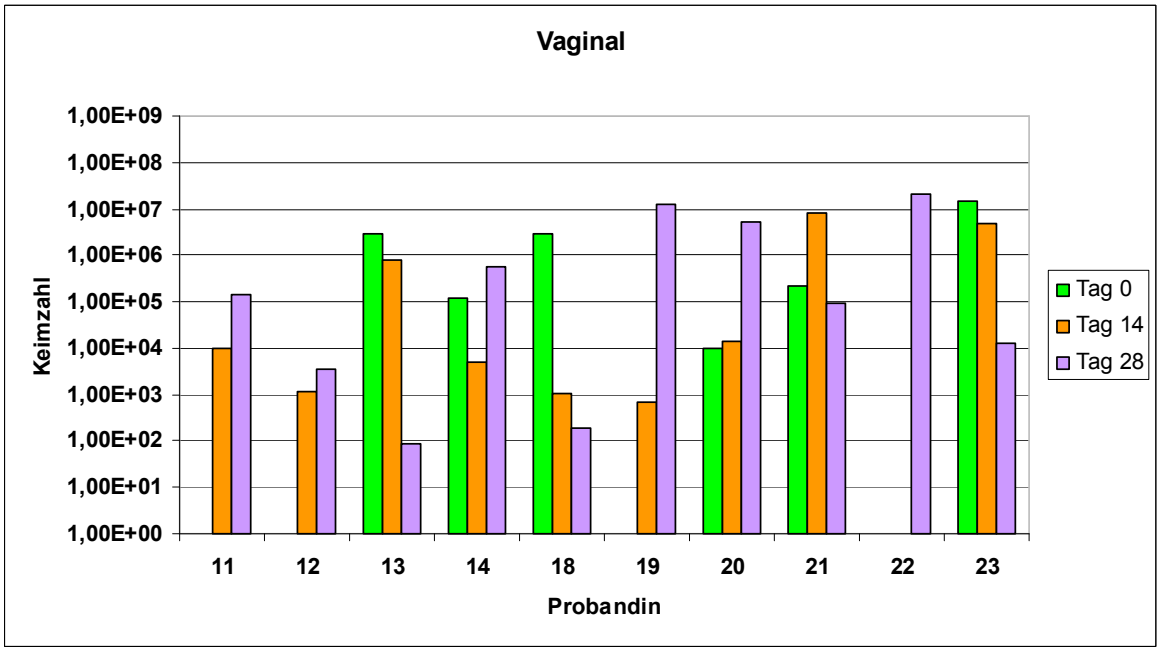

Abb. 4-4: Probandin 11-23

Grafische Darstellung der rektalen und vaginalen Keimzahlen der Abstriche 24-33

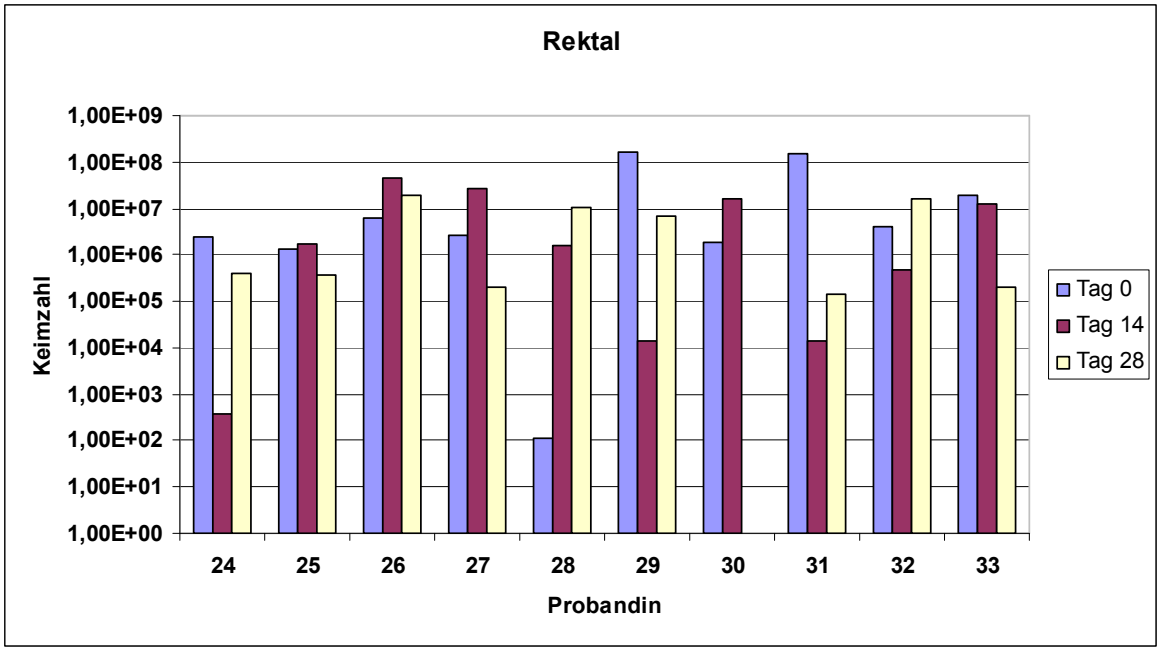

Abb. 4-5: Probandin 24-33, rektale Abstriche von Probandin 30 (Tag 28) nicht vorhanden

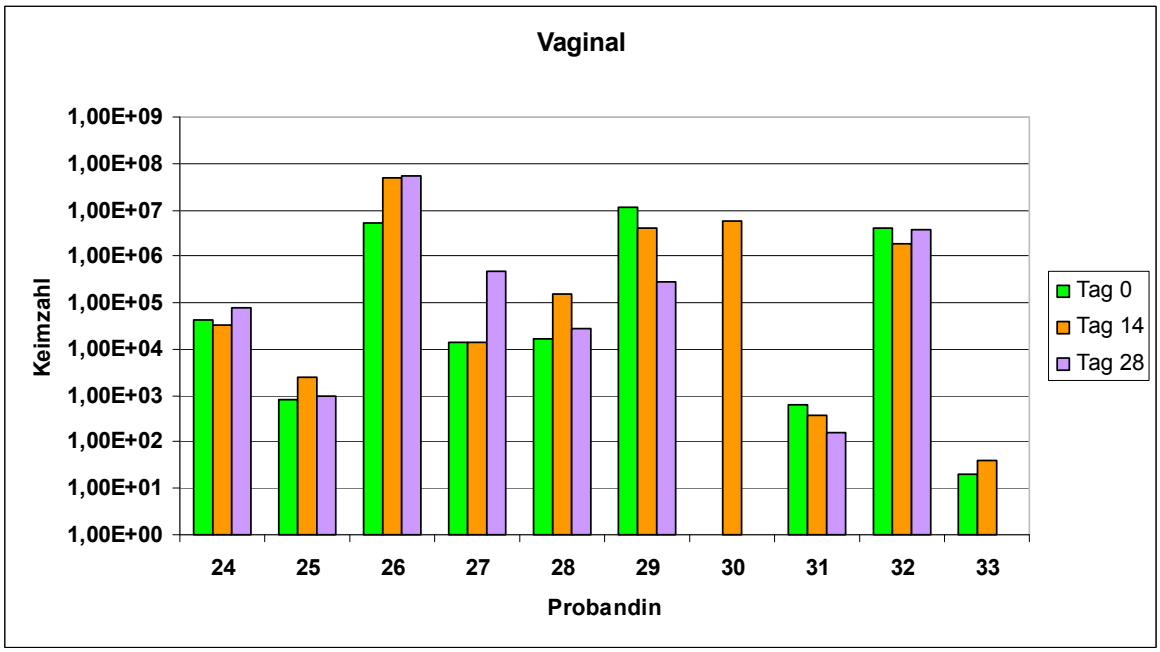

Abb. 4-6: Probandin 24-33, vaginale Abstriche von Probandin 30 (Tag 28) nicht vorhanden

Grafische Darstellung der rektalen und vaginalen Keimzahlen der Abstriche 34-43

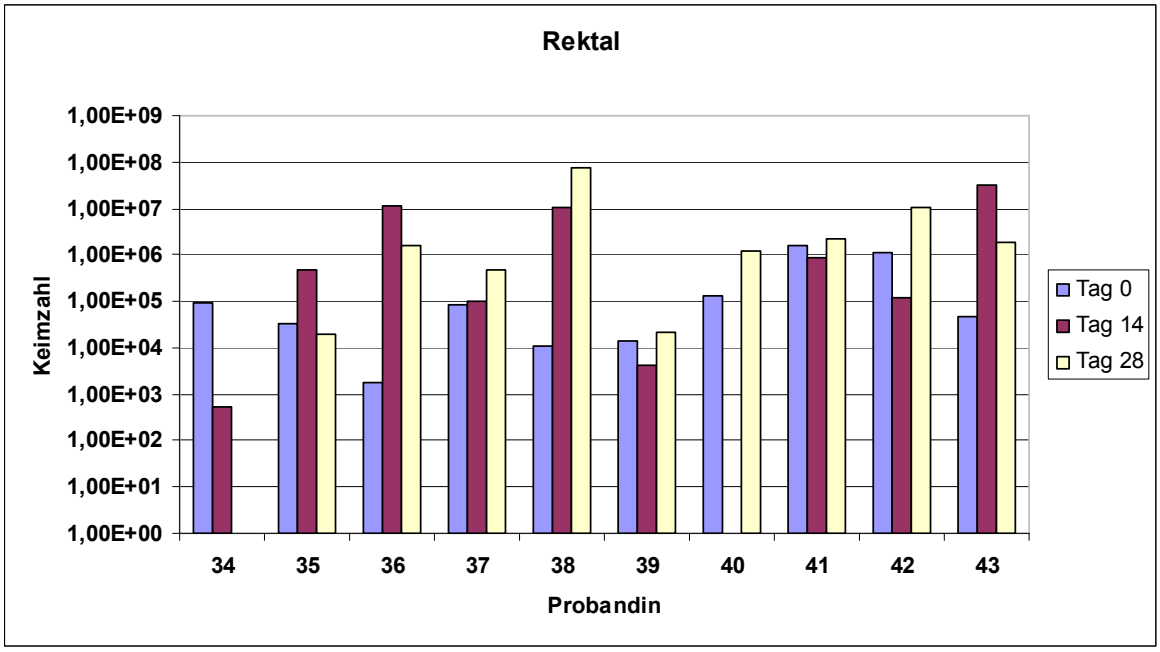

Abb. 4-7: Probandin 34-43, rektale Abstriche von Probandin 34 (Tag 28) nicht vorhanden

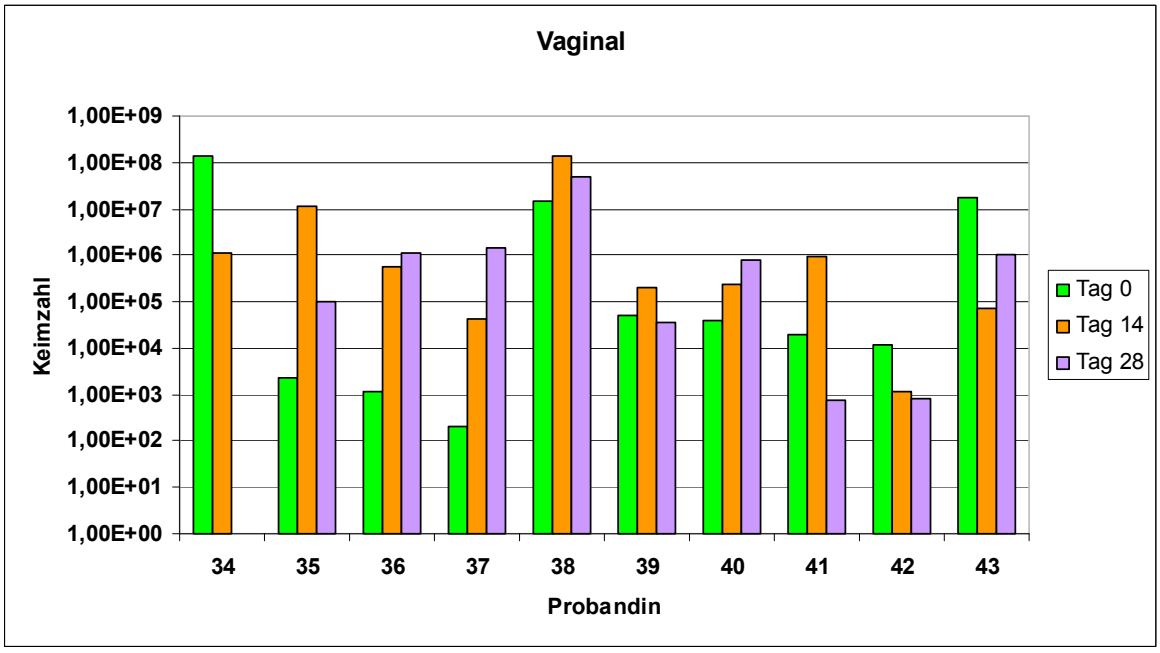

Abb. 4-8: Probandin 34-43, vaginale Abstriche von Probandin 34 (Tag 28) nicht vorhanden.

Grafische Darstellung der rektalen und vaginalen Keimzahlen der Proben 44-50

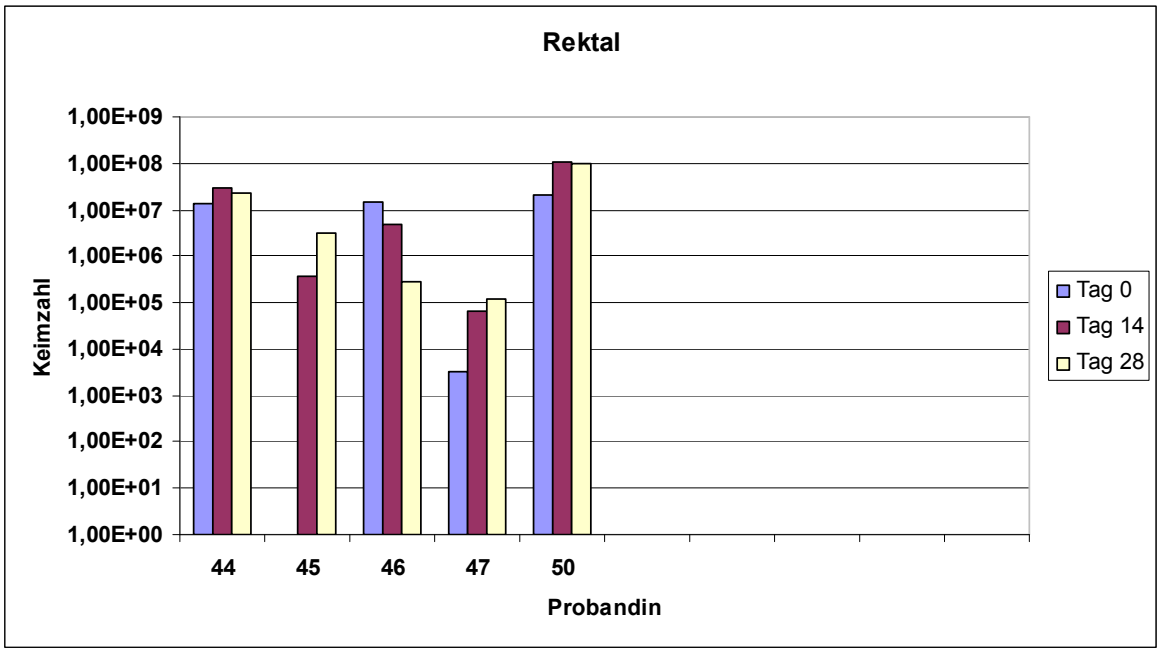

Abb. 4-9: Probandin 44-50,

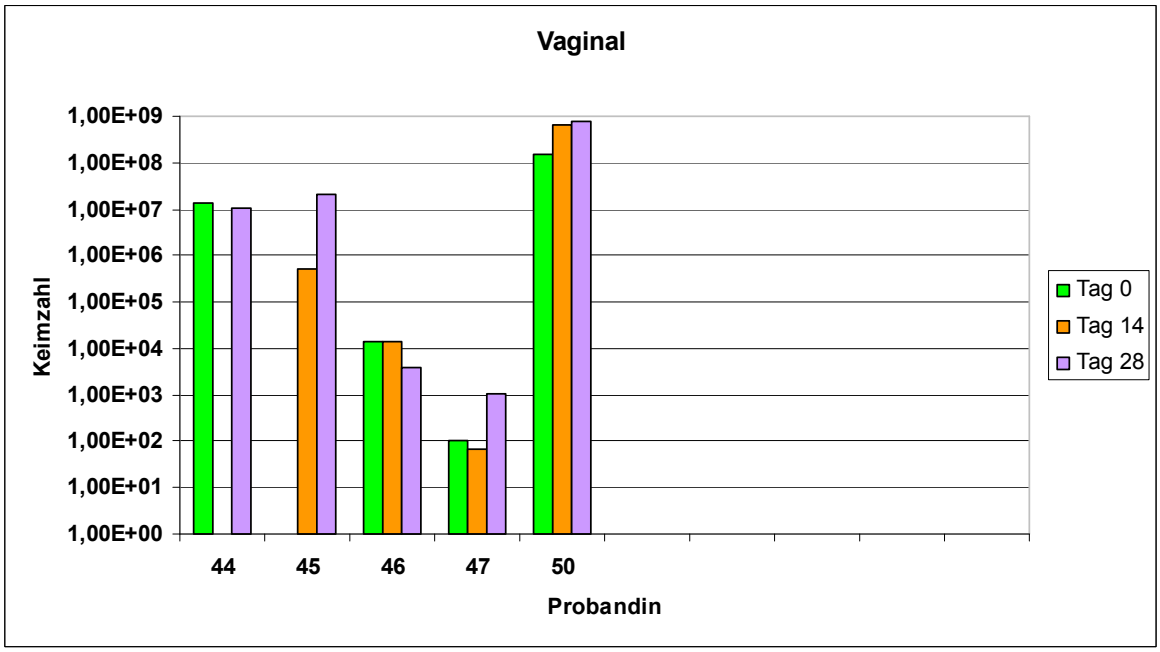

Abb. 4-10: Probandin 44-50,

Ein direkter Vergleich der Keimzahlen, der vaginalen und rektalen Abstriche der einzelnen Probandinnen, ist in den Abbildungen 4-11 bis 4-56 dargestellt.

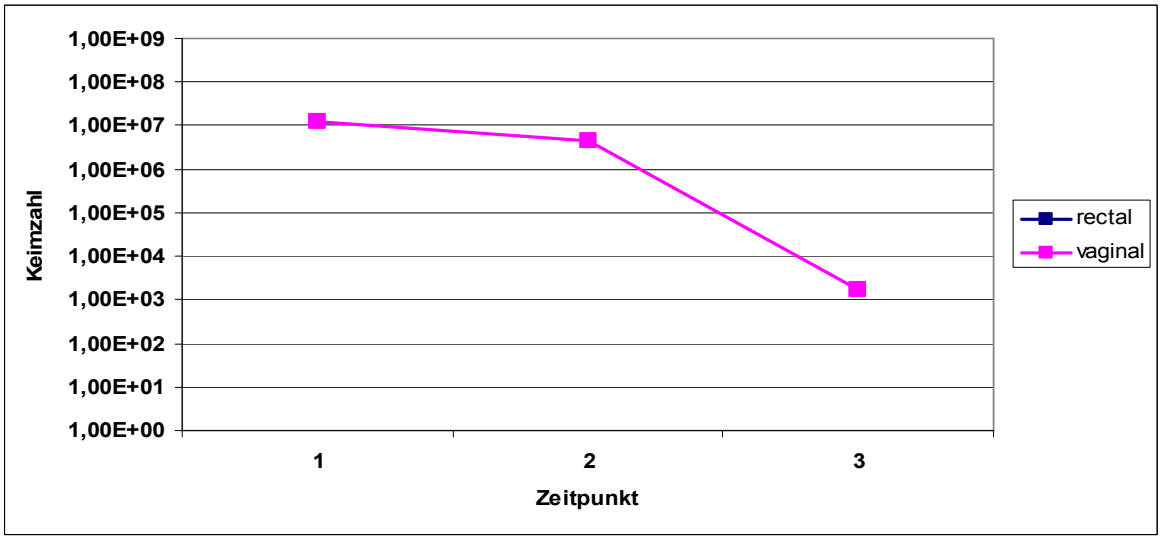

Abb. 4-11: Probandin 1, rektale Abstriche sind nicht vorhanden

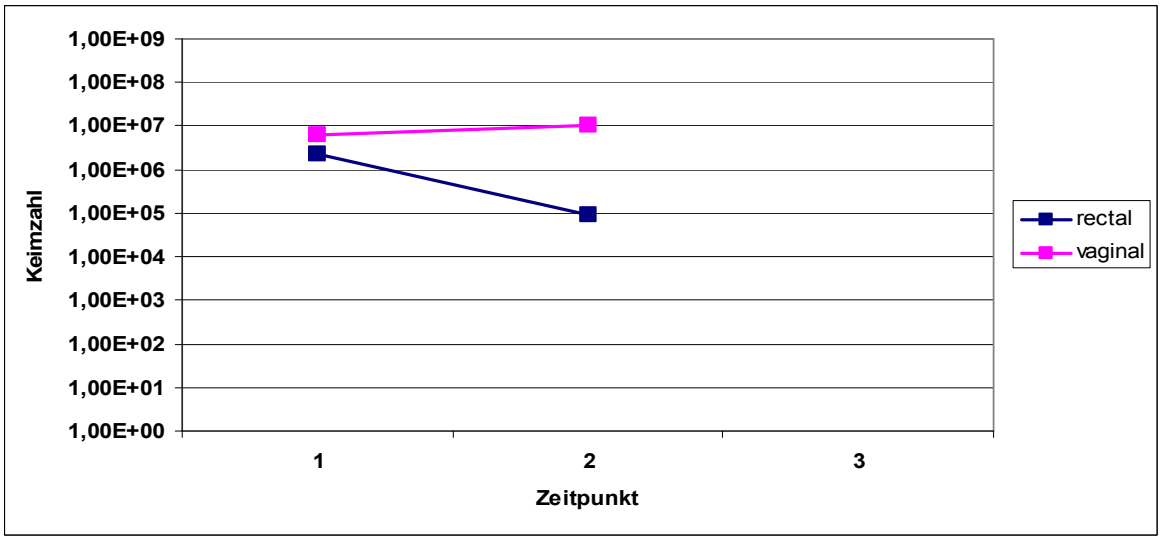

Abb. 4-12: Probandin 2; rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkte 3 (Tag 28) nicht vorhanden

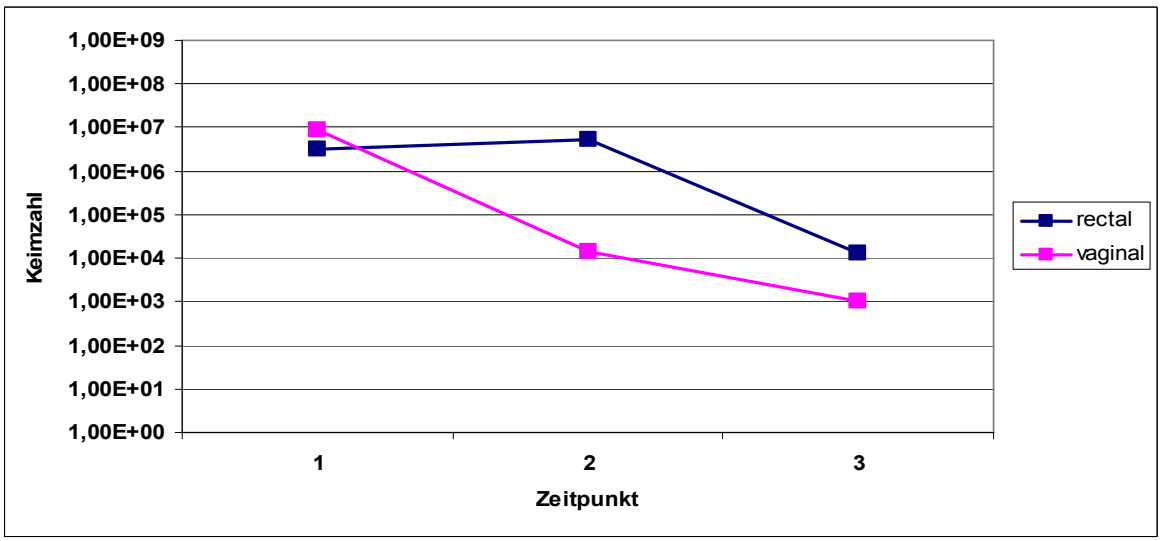

Abb. 4-13: Probandin 3

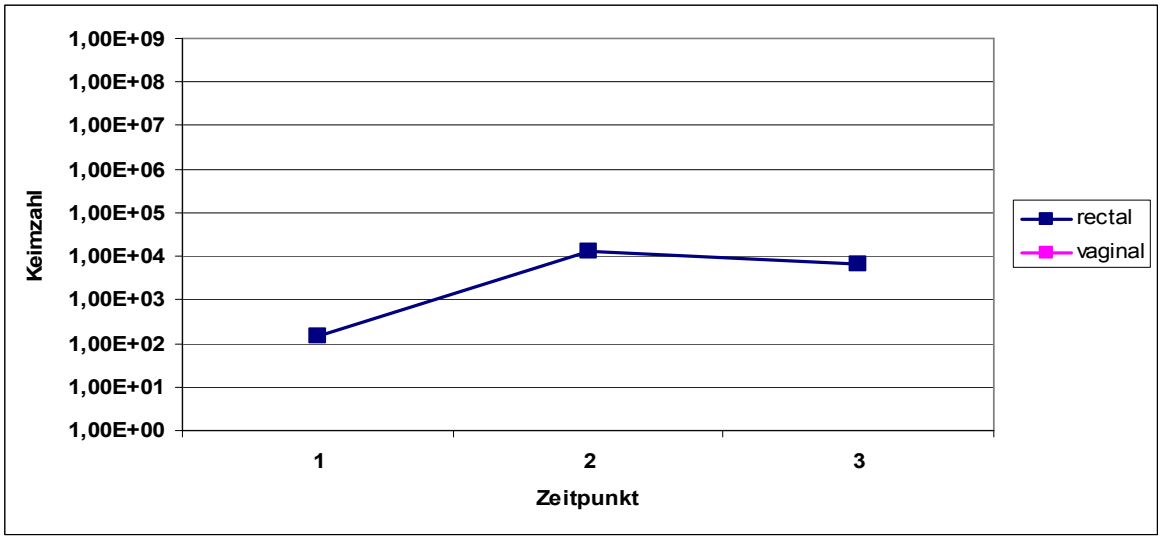

Abb. 4-14: Probandin 4

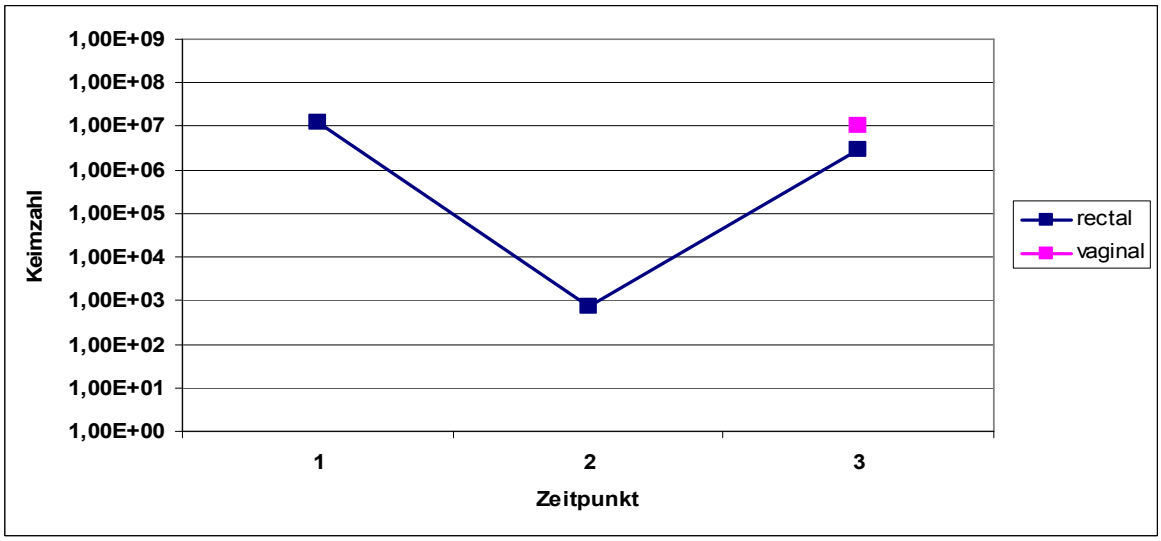

Abb. 4-15. Probandin 5

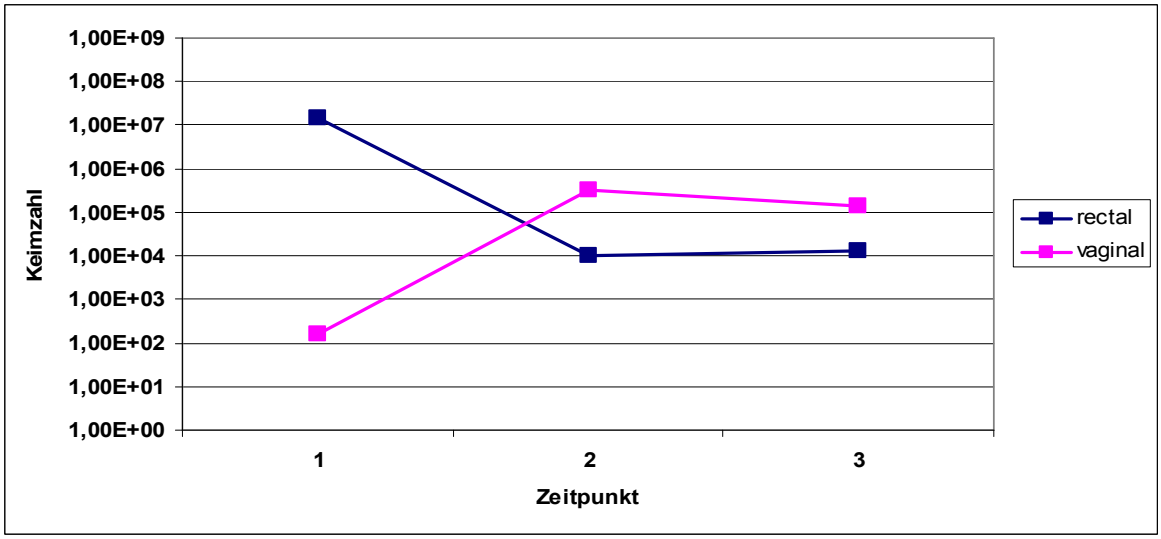

Abb. 4-16: Probandin 6

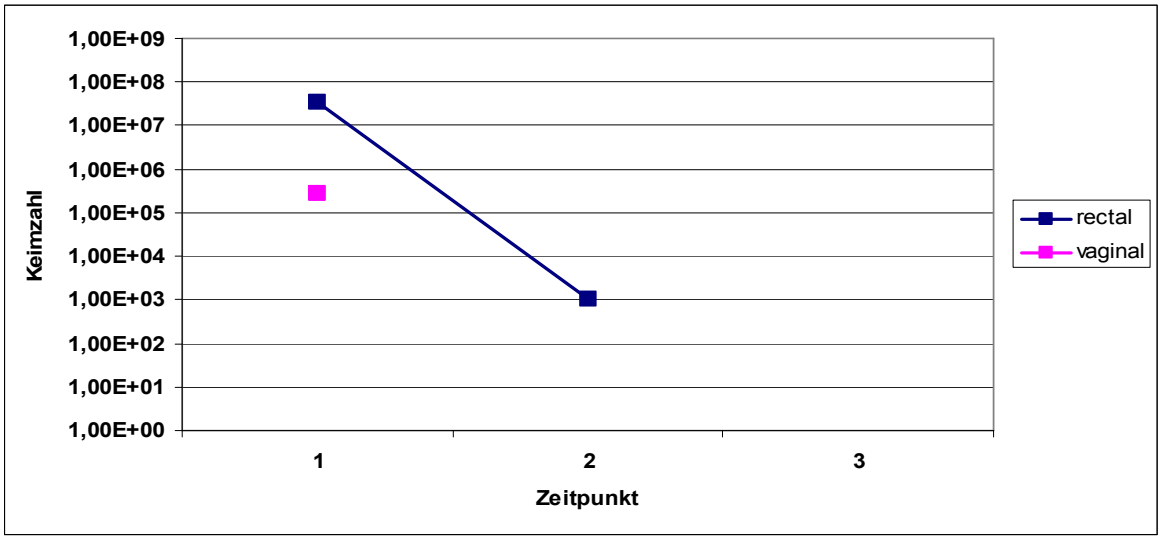

Abb. 4-17: Probandin 7; rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkt 3 (Tag 28) nicht vorhanden

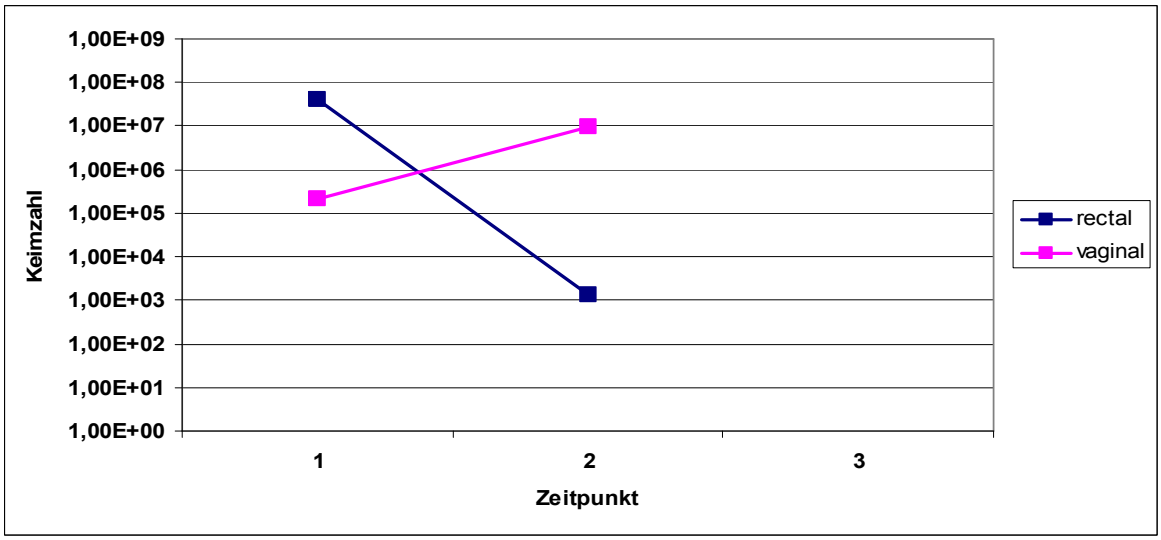

Abb. 4-18: Probandin 8; rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkt 3 (Tag 28) nicht vorhanden

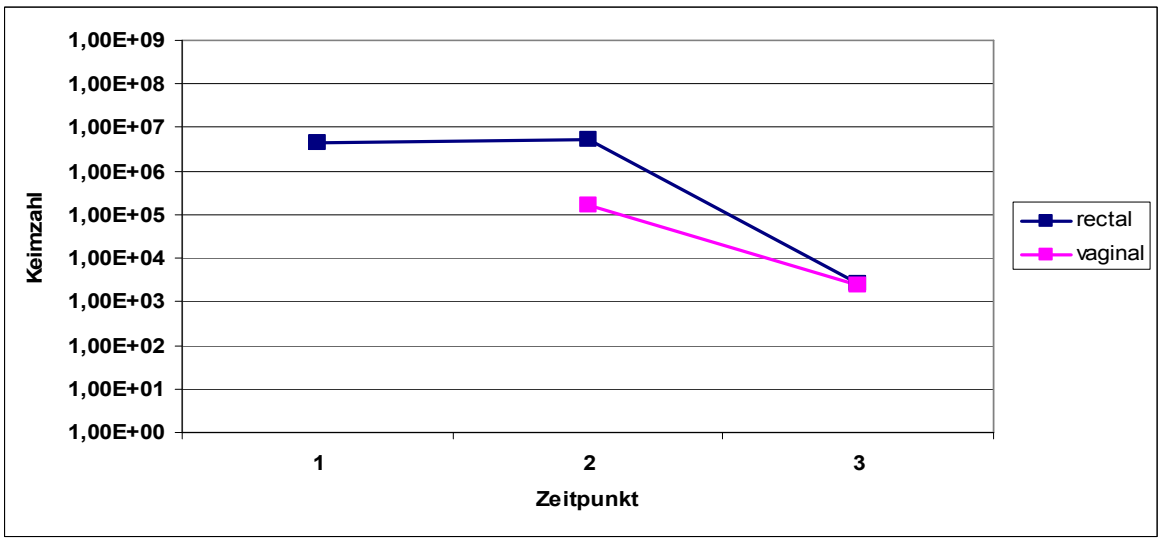

Abb. 4-19: Probandin 9

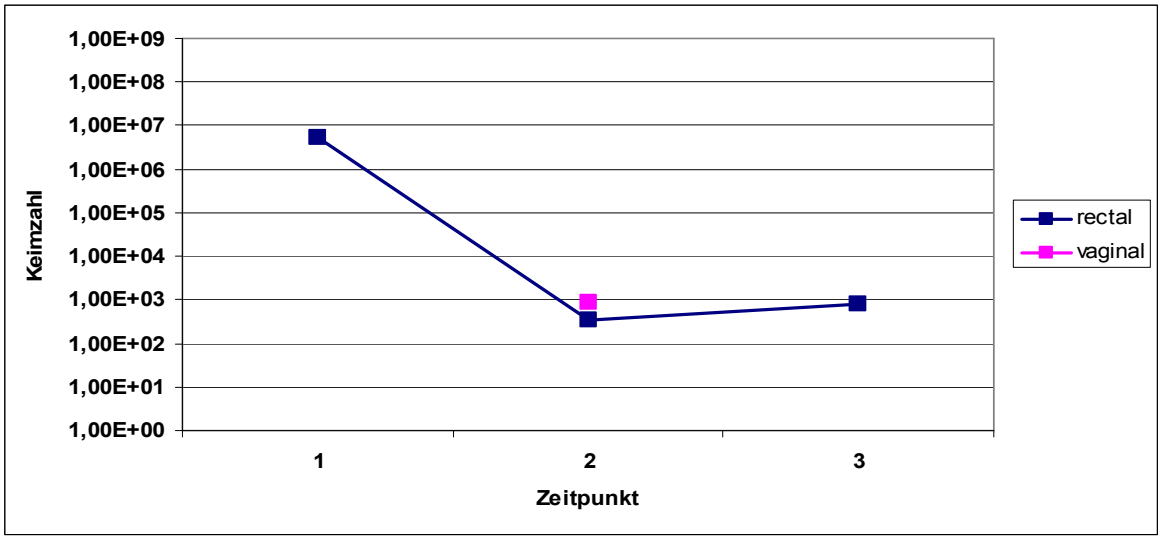

Abb. 4-20: Probandin 10

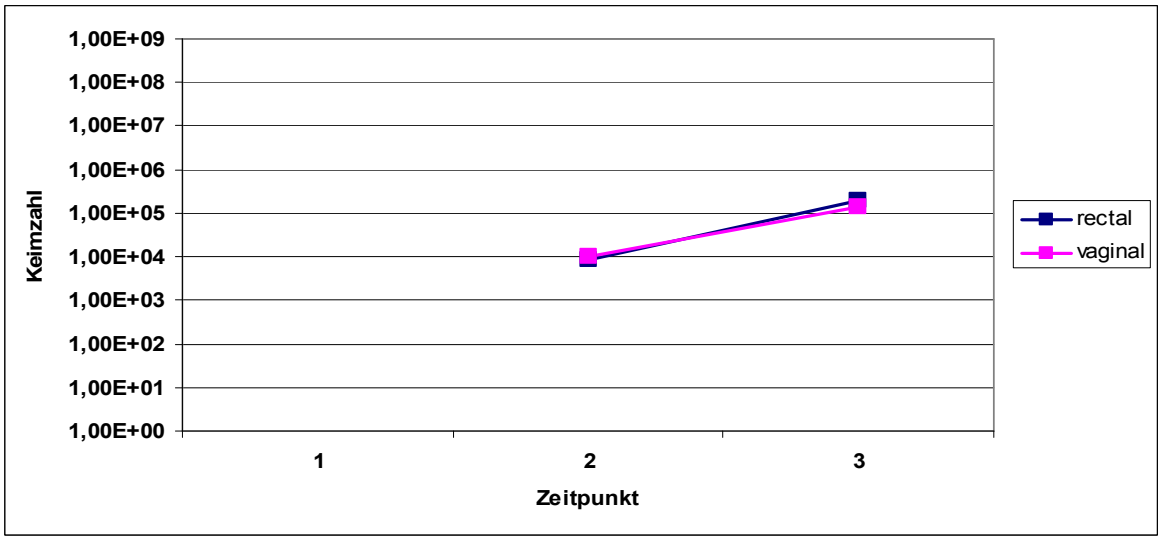

Abb. 4-21: Probandin 11

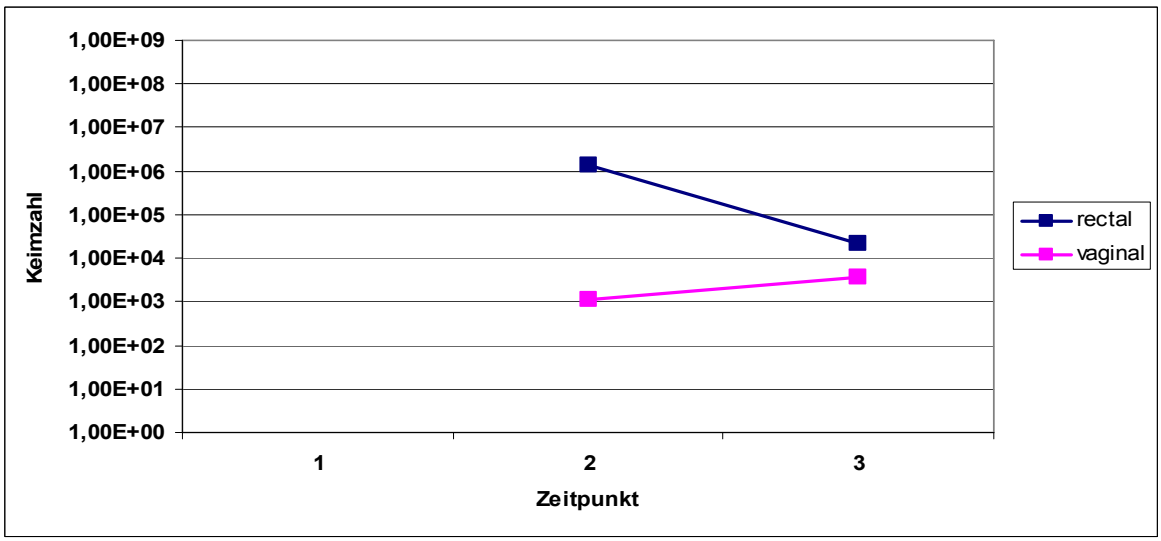

Abb. 4-22: Probandin 12

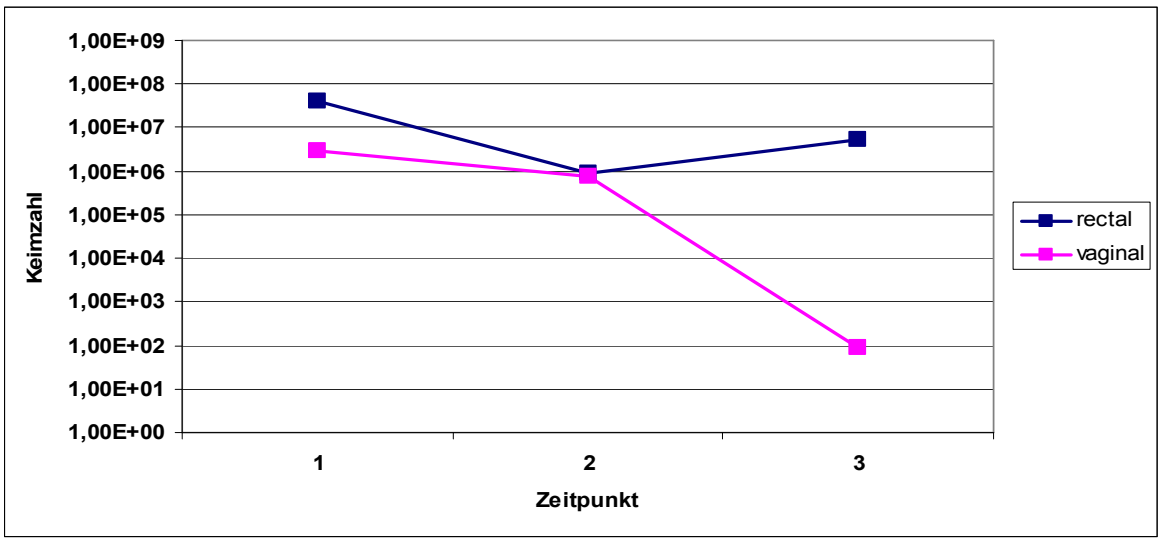

Abb. 4-23: Probandin 13

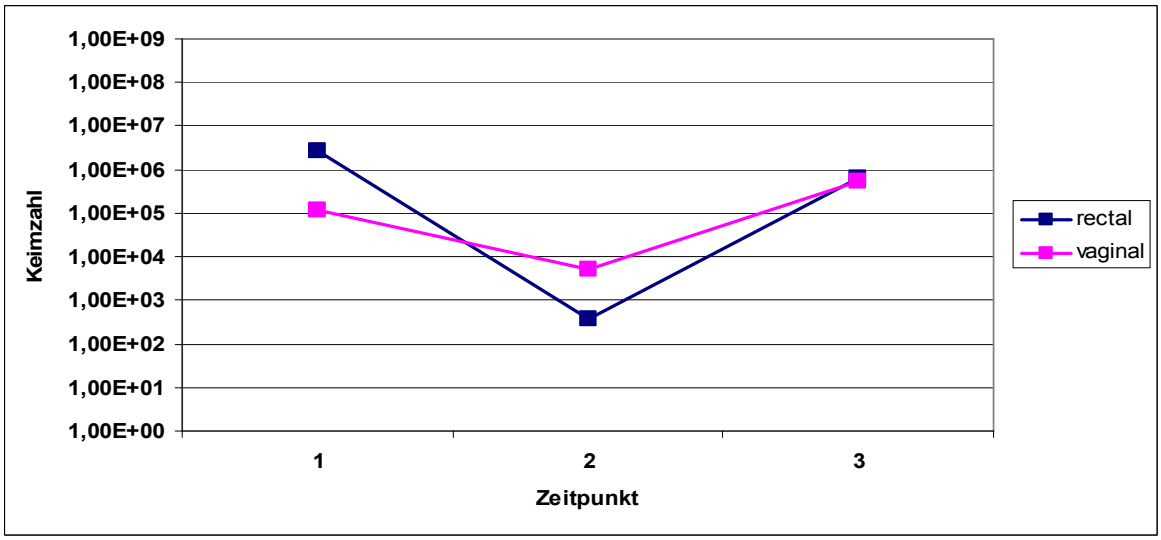

Abb. 4-24: Probandin 14

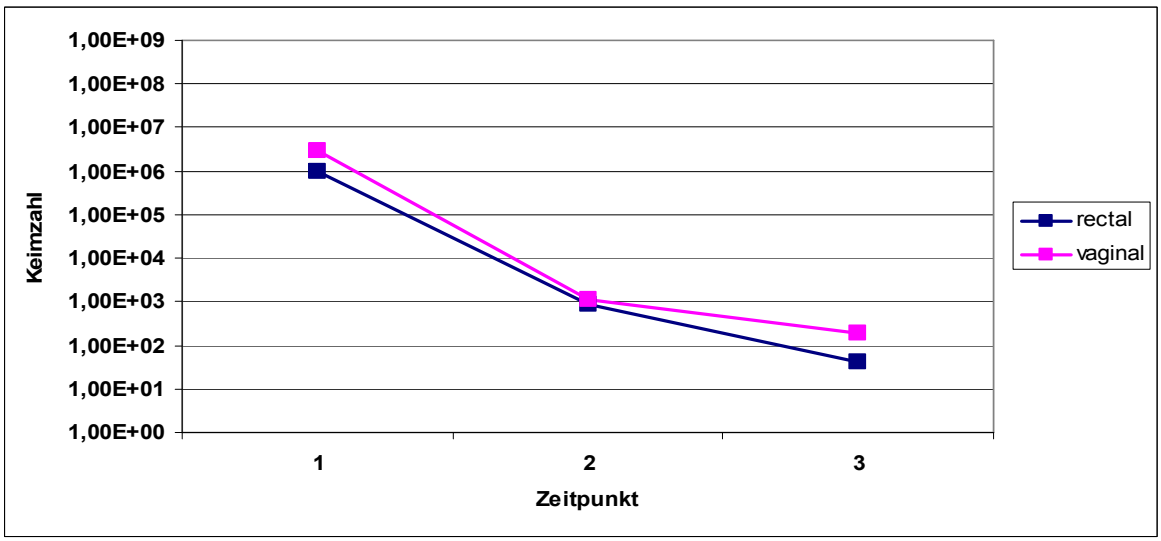

Abb. 4-25. Probandin 18

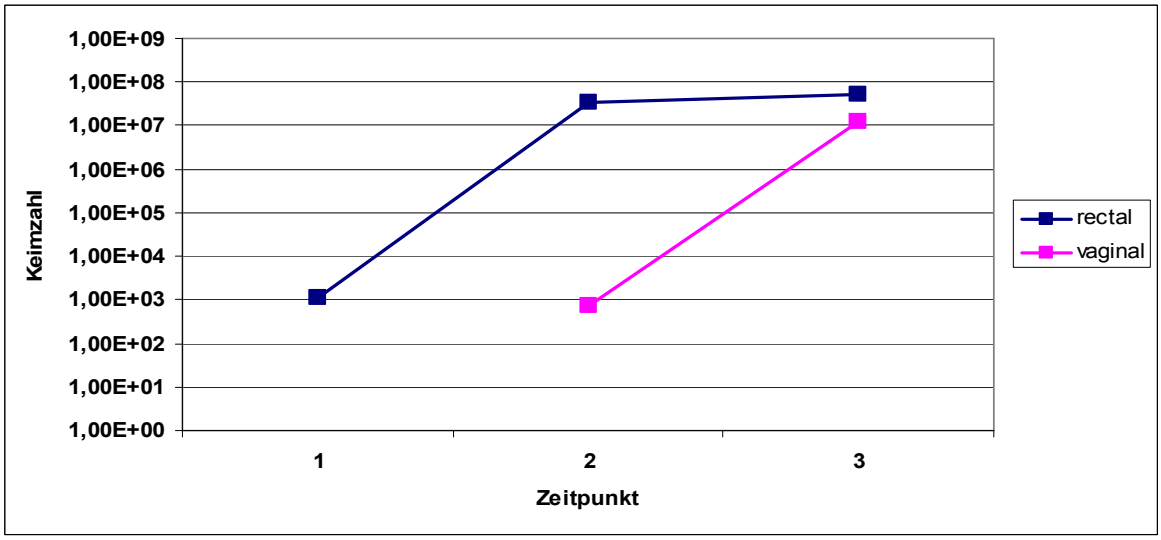

Abb. 4-26: Probandin 19

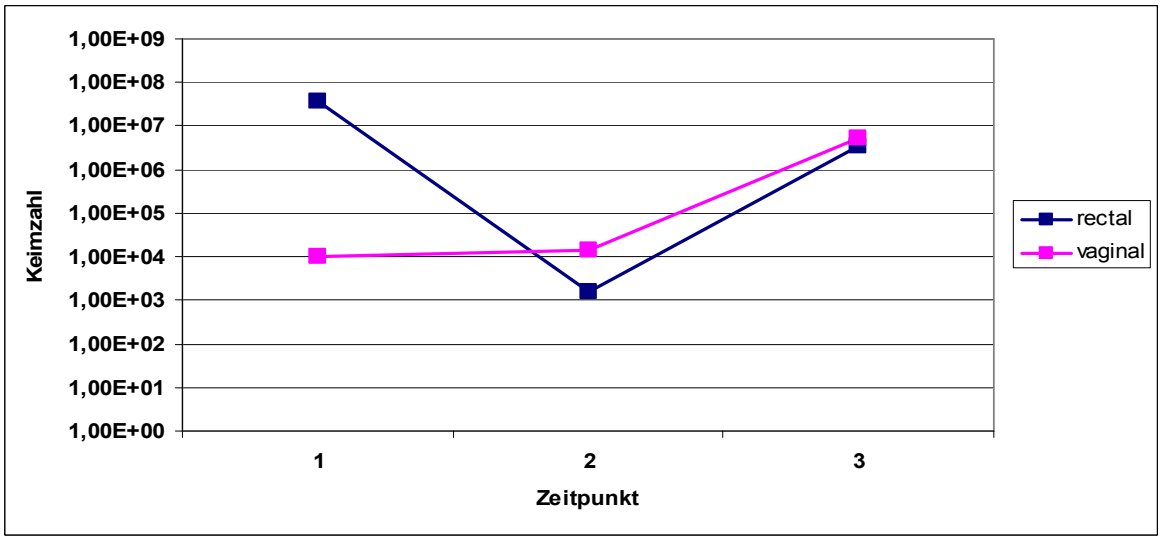

Abb. 4-27: Probandin 20

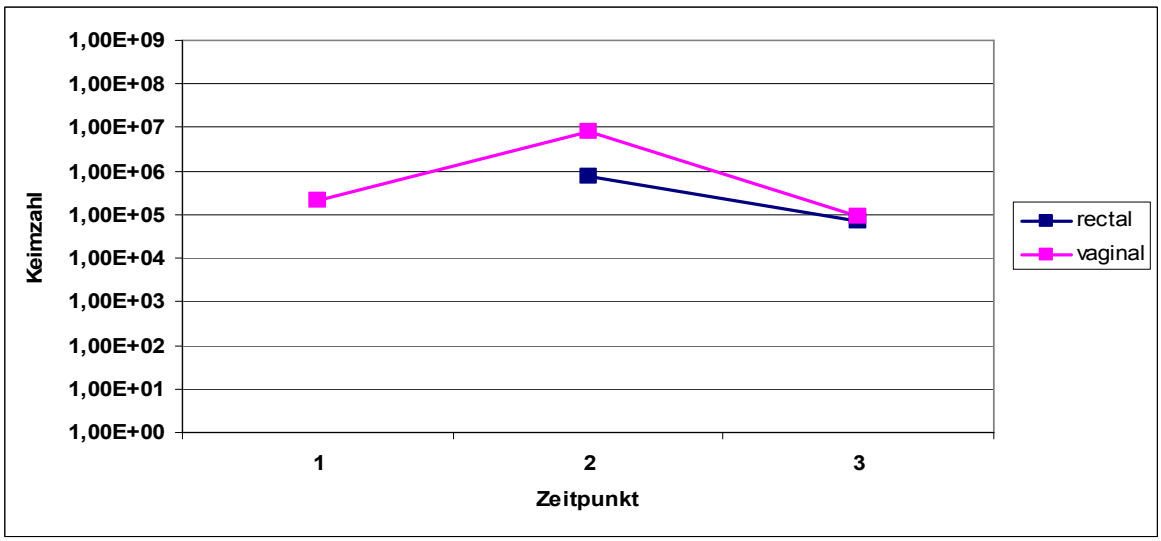

Abb. 4-28: Probandin 21

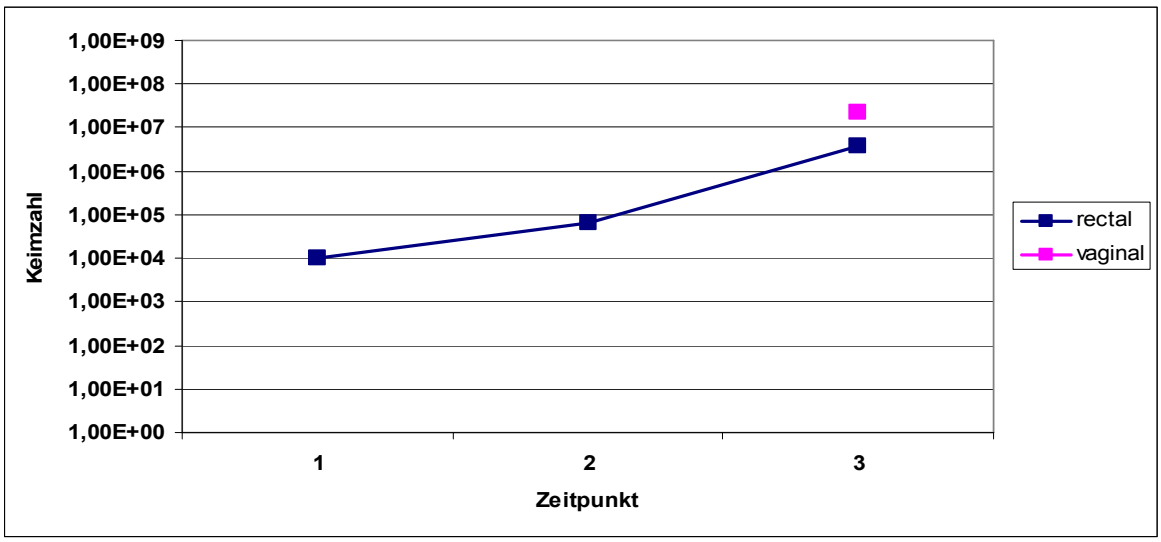

Abb. 4-29: Probandin 22

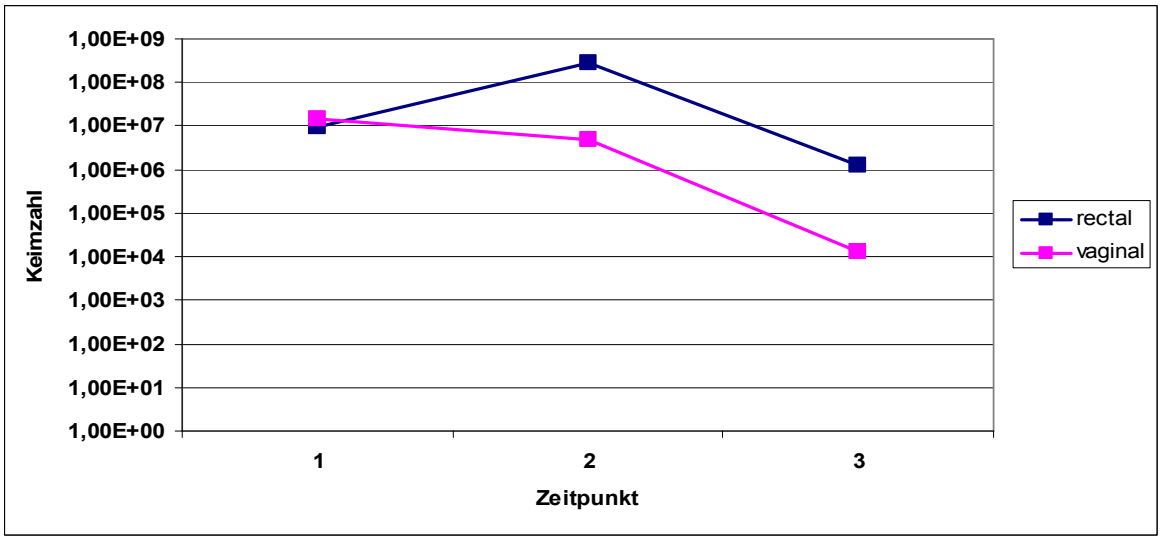

Abb. 4-30: Probandin 23

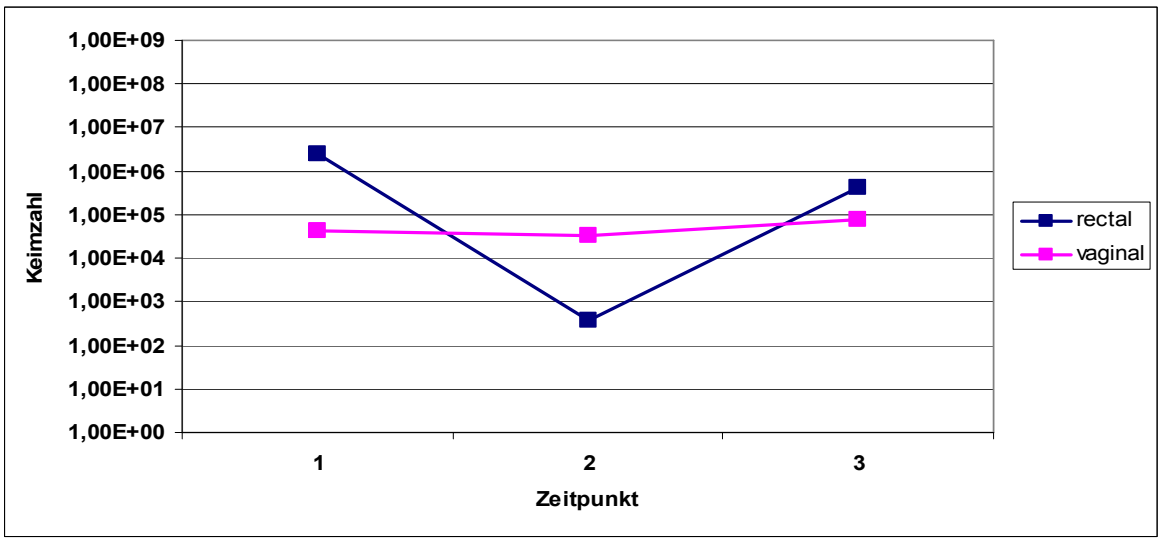

Abb. 4-31: Probandin 24

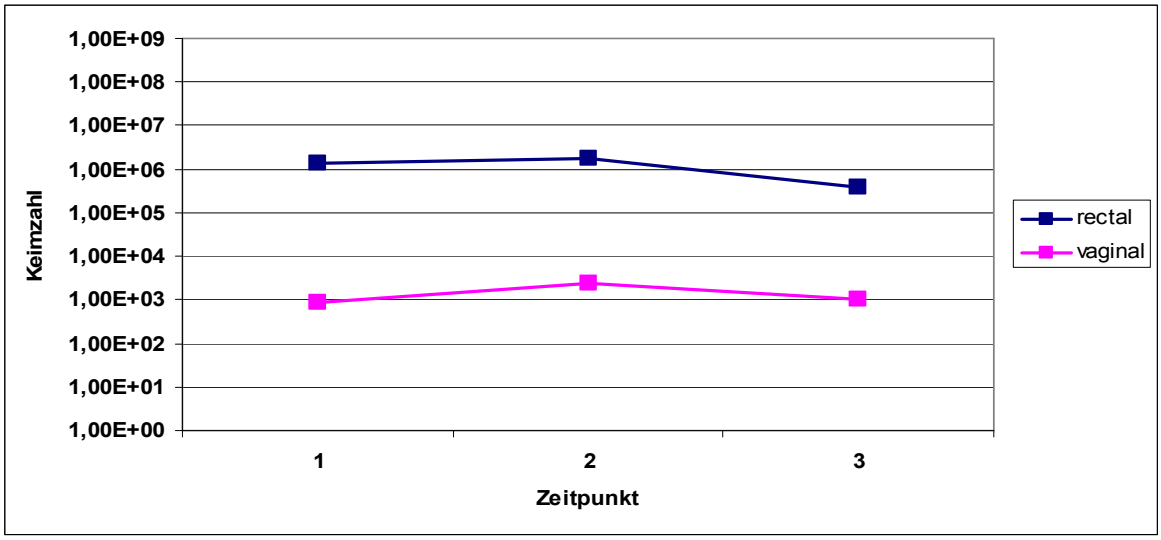

Abb. 4-32: Probandin 25

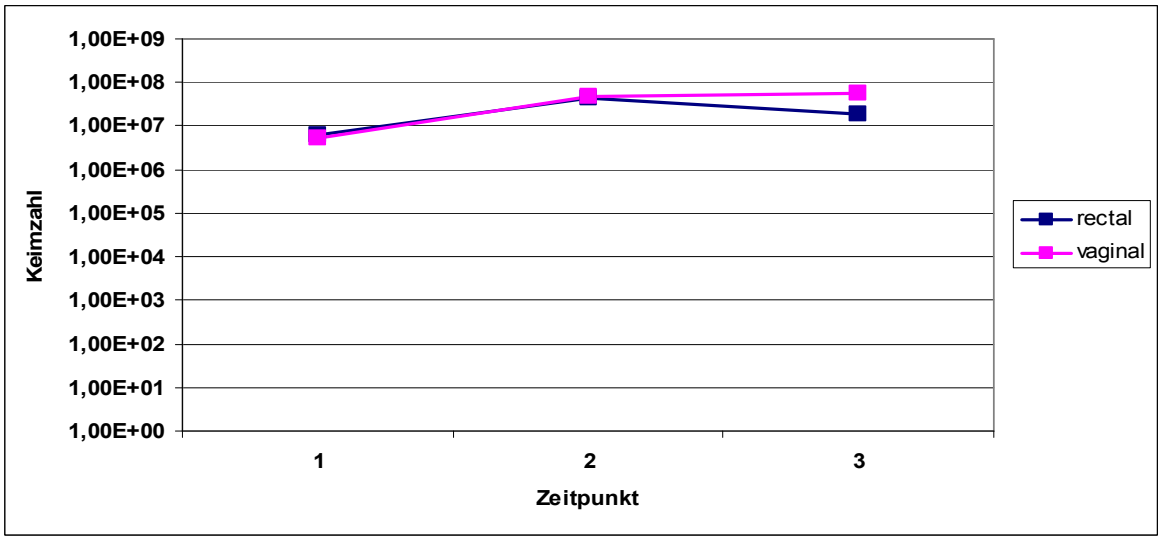

Abb. 4-33: Probandin 26

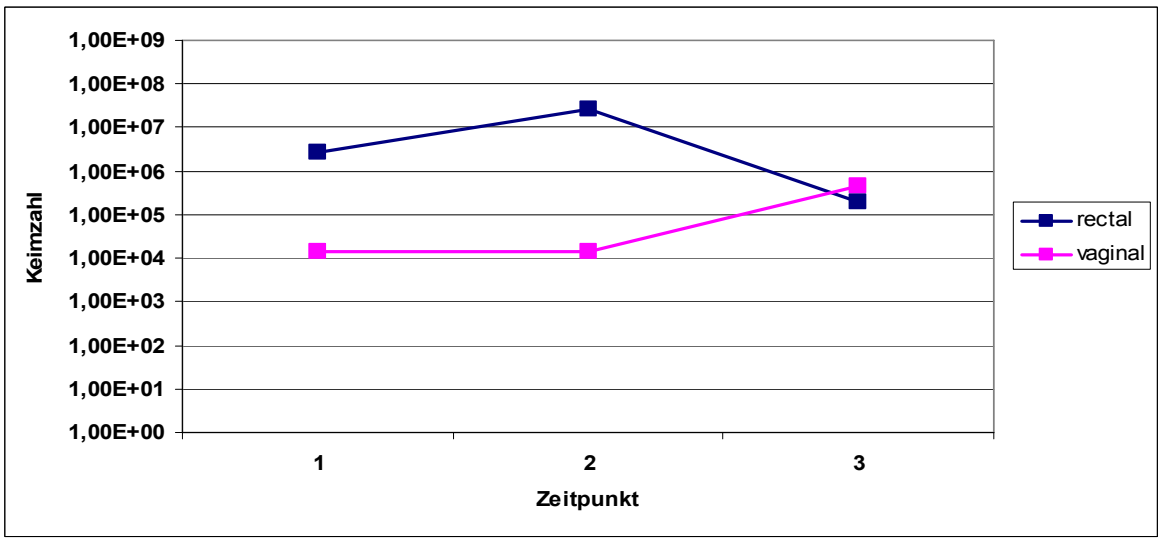

Abb. 4-34: Probandin 27

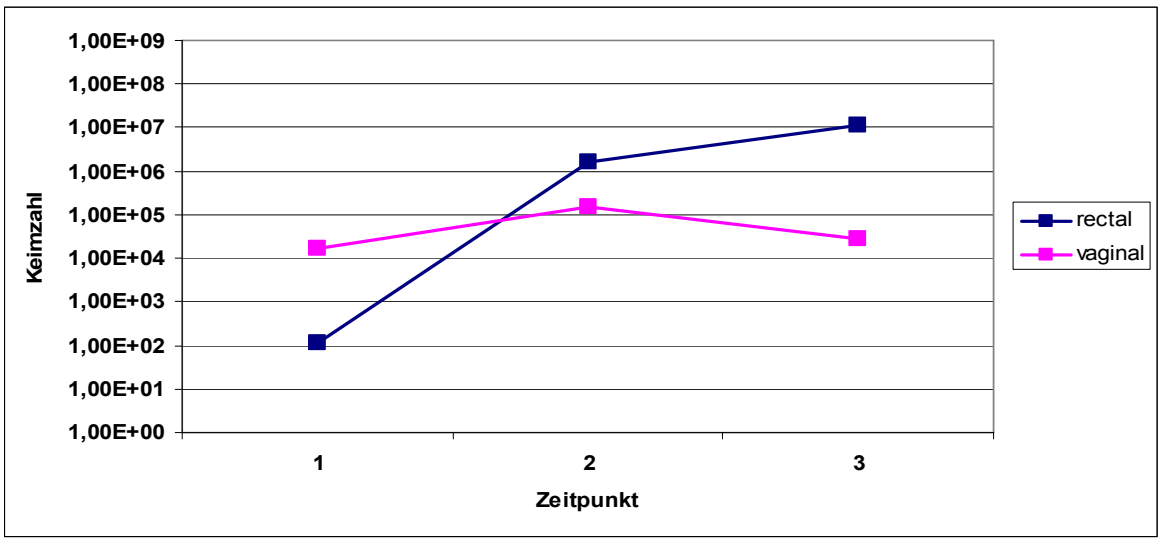

Abb. 4-35: Probandin 28

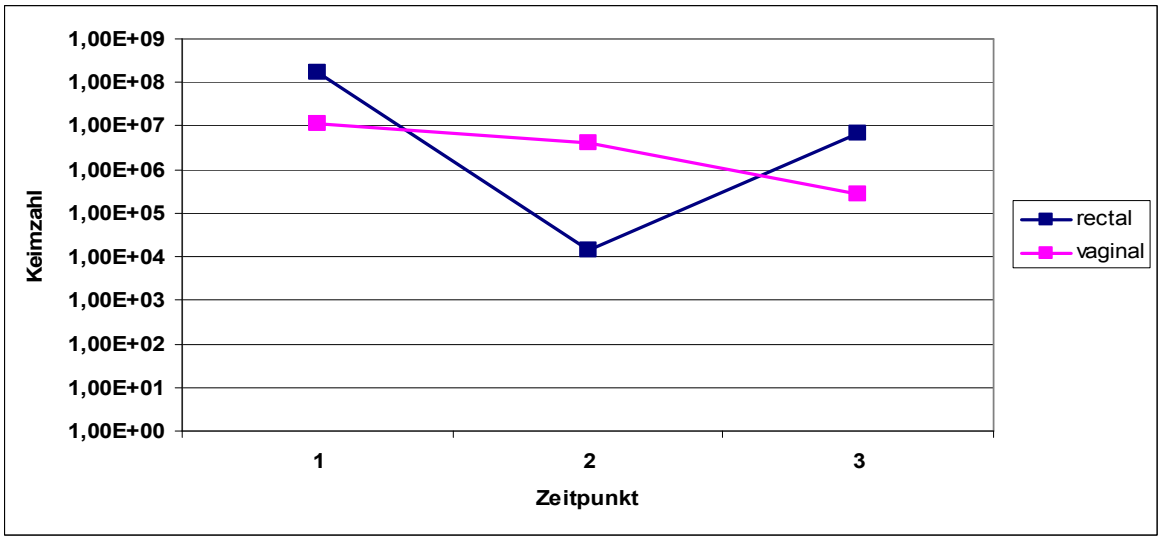

Abb. 4-36: Probandin 29

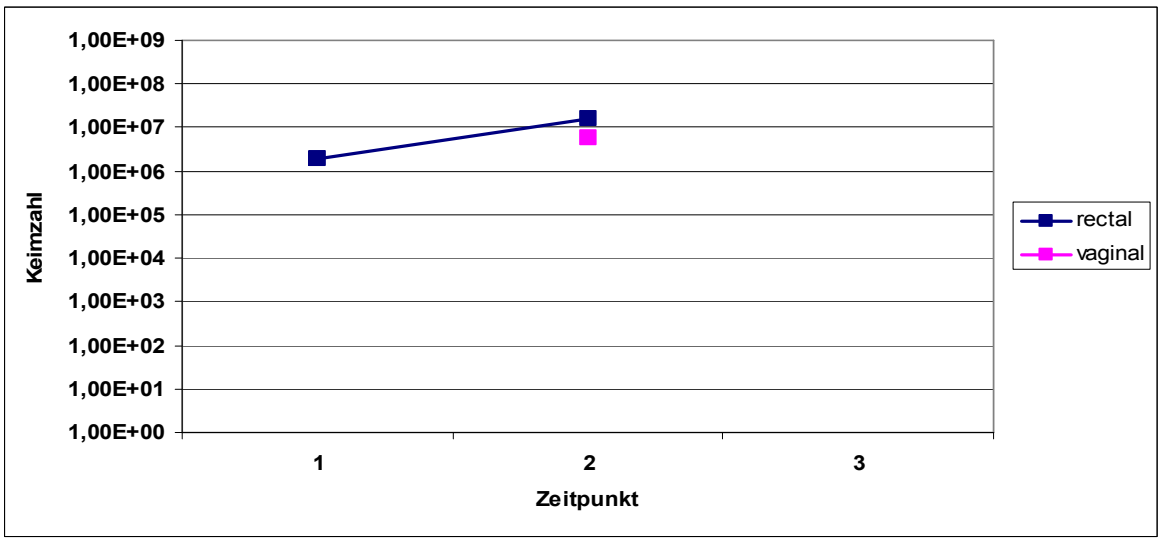

Abb. 4-37: Probandin 30, rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkt 3 (Tag 28) nicht vorhanden

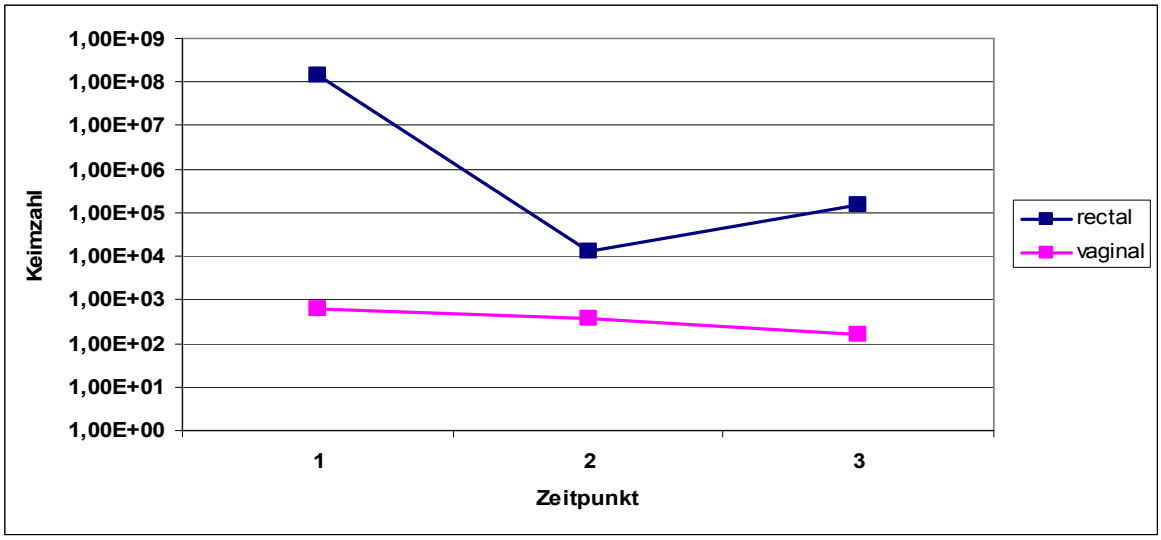

Abb. 4-38: Probandin 31

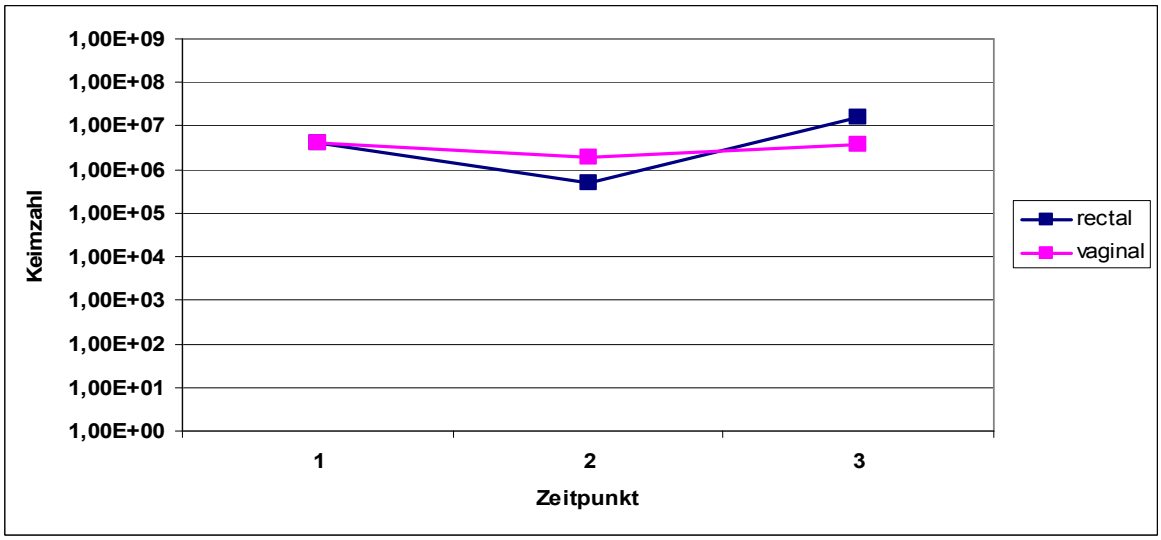

Abb. 4-39: Probandin 32

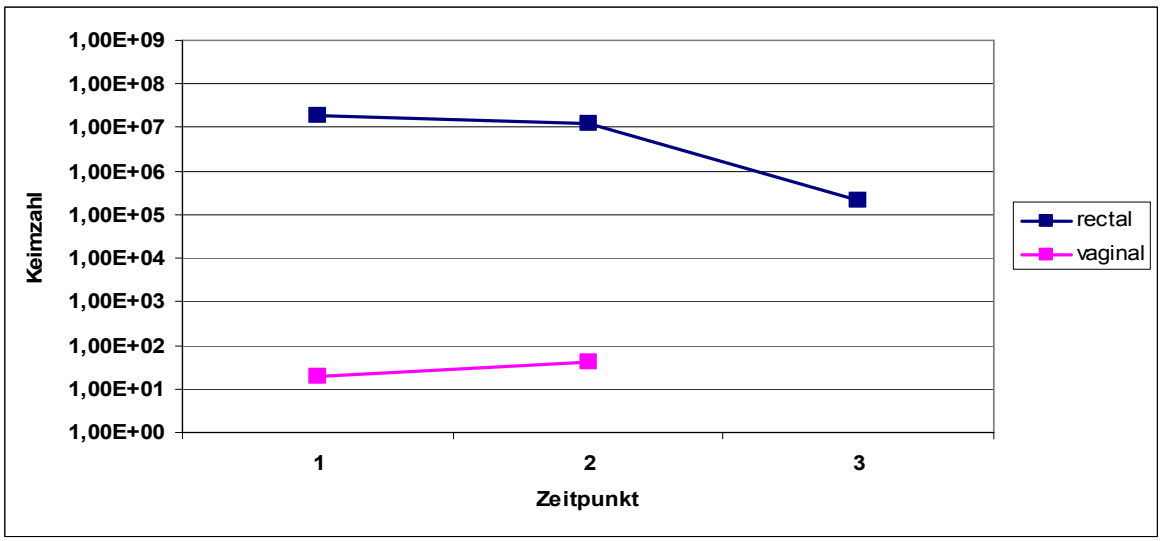

Abb. 4-40: Probandin 33

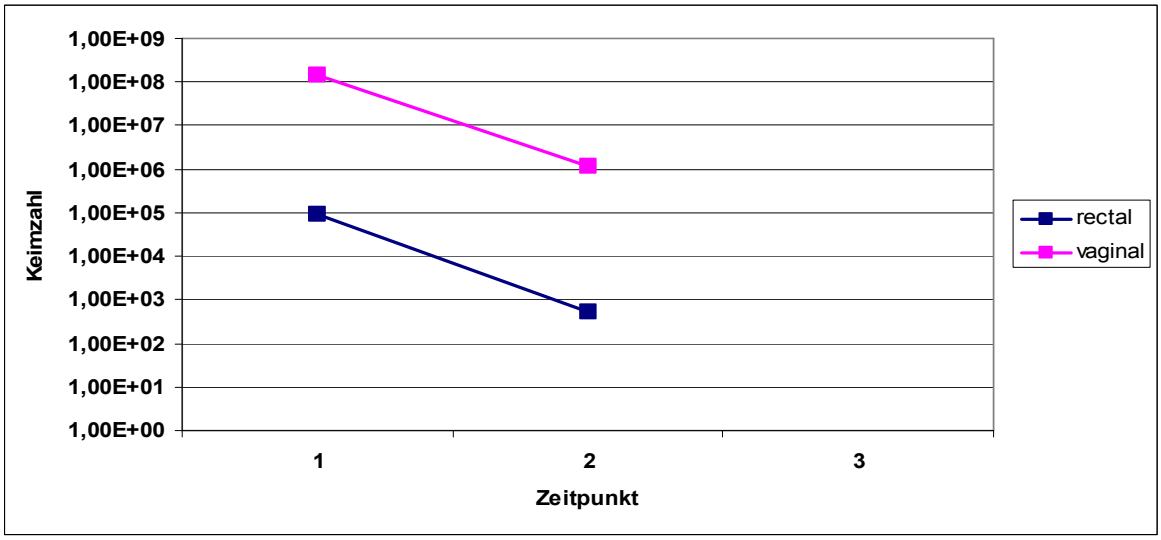

Abb. 4-41: Probandin 34; rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkt 3 (Tag 28) nicht vorhanden

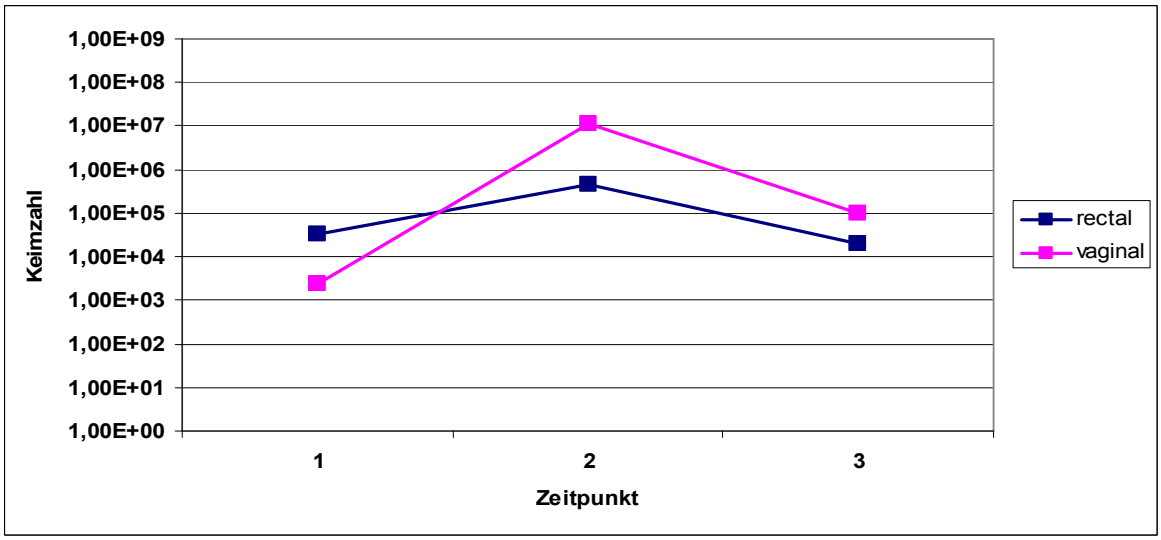

Abb. 4-42: Probandin 35

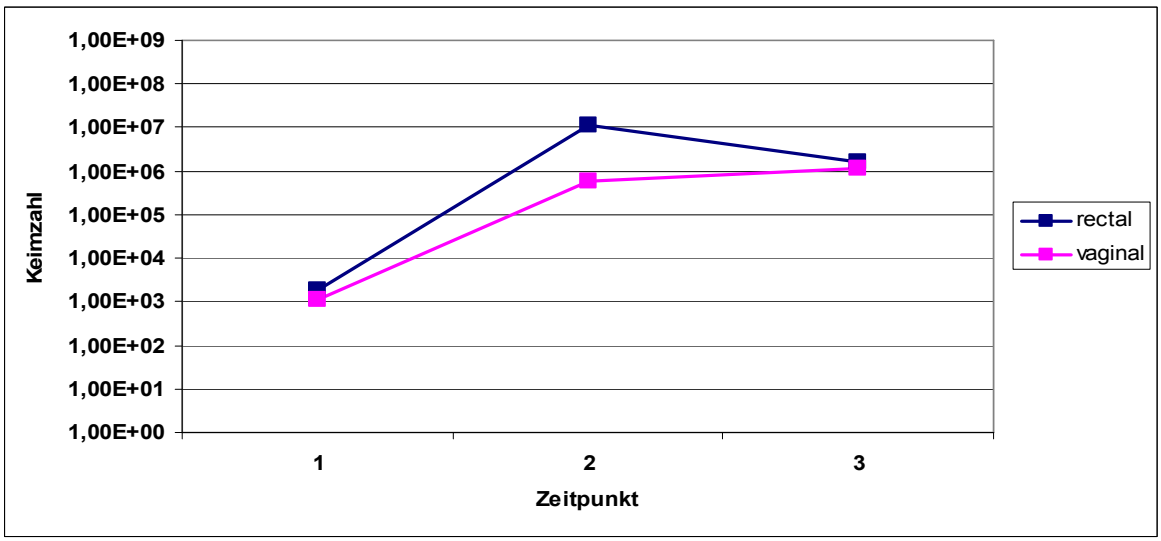

Abb. 4-43: Probandin 36

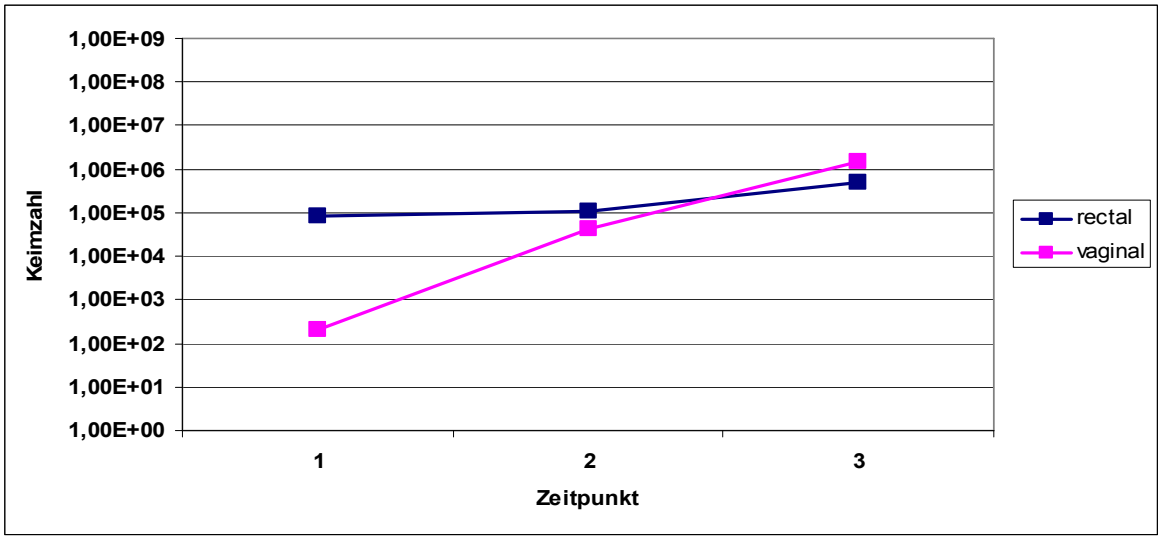

Abb. 4-44: Probandin 37

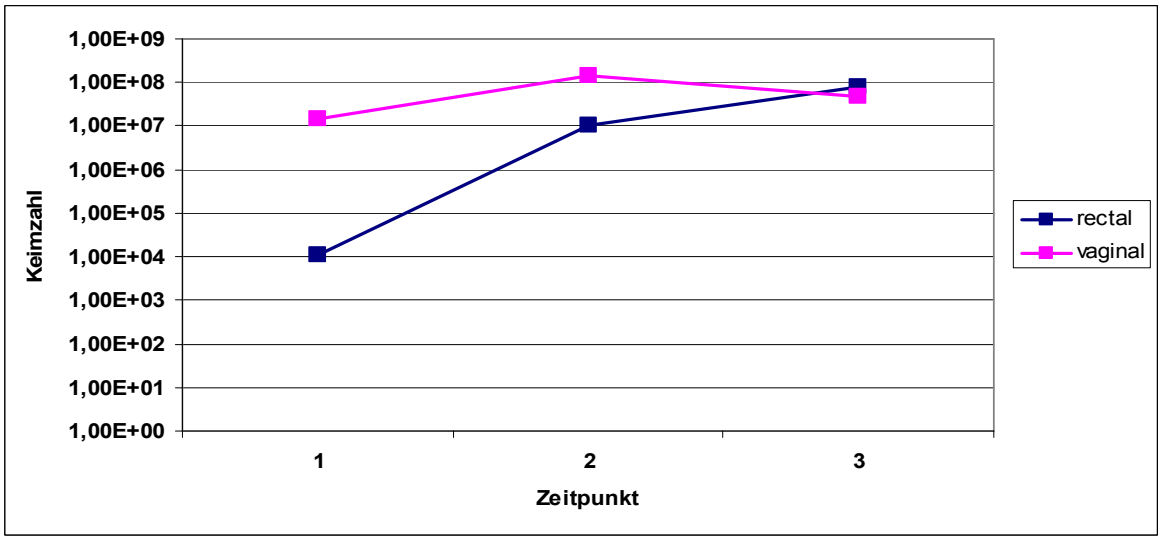

Abb. 4-45: Probandin 38

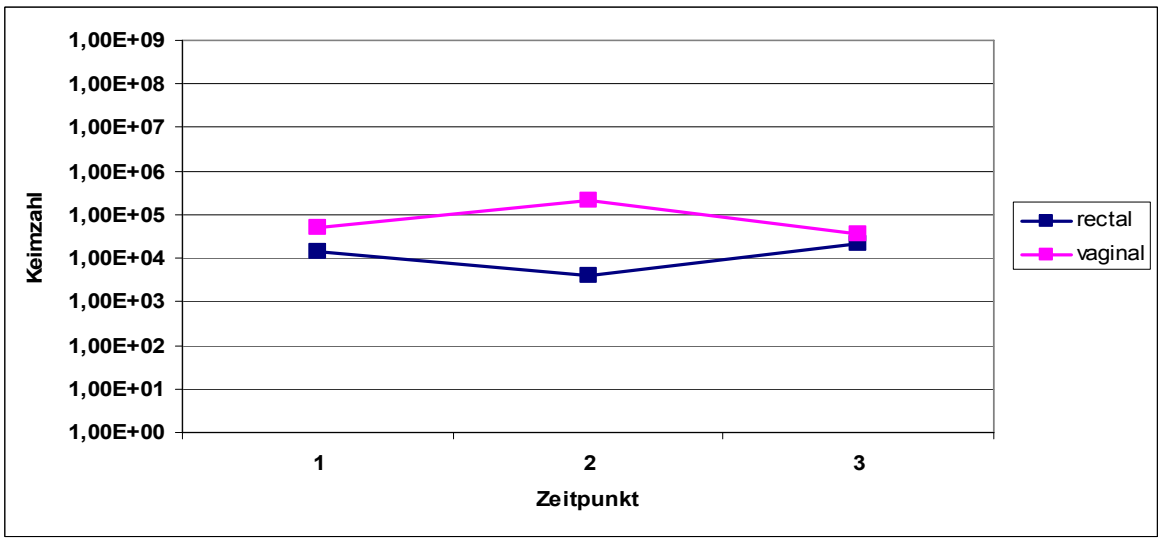

Abb. 4-46: Probandin 39

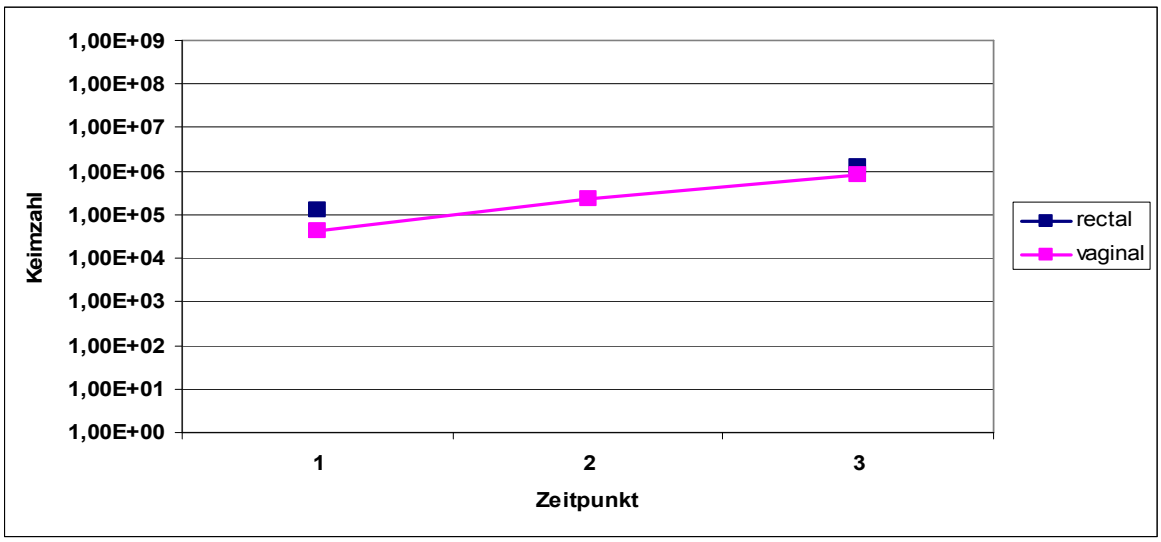

Abb. 4-47: Probandin 40

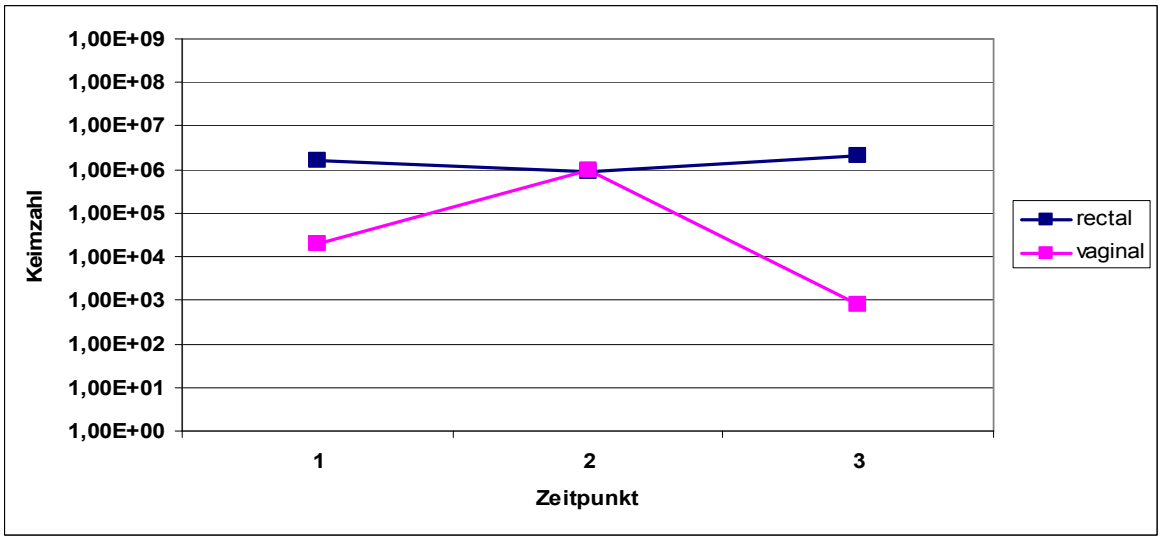

Abb. 4-48: Probandin 41

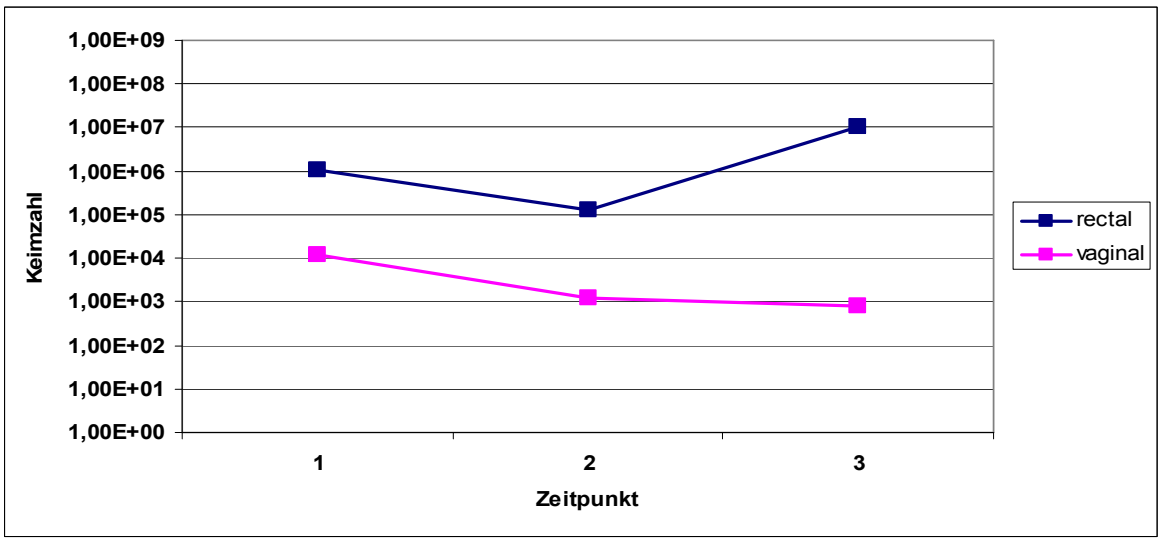

Abb. 4-49: Probandin 42

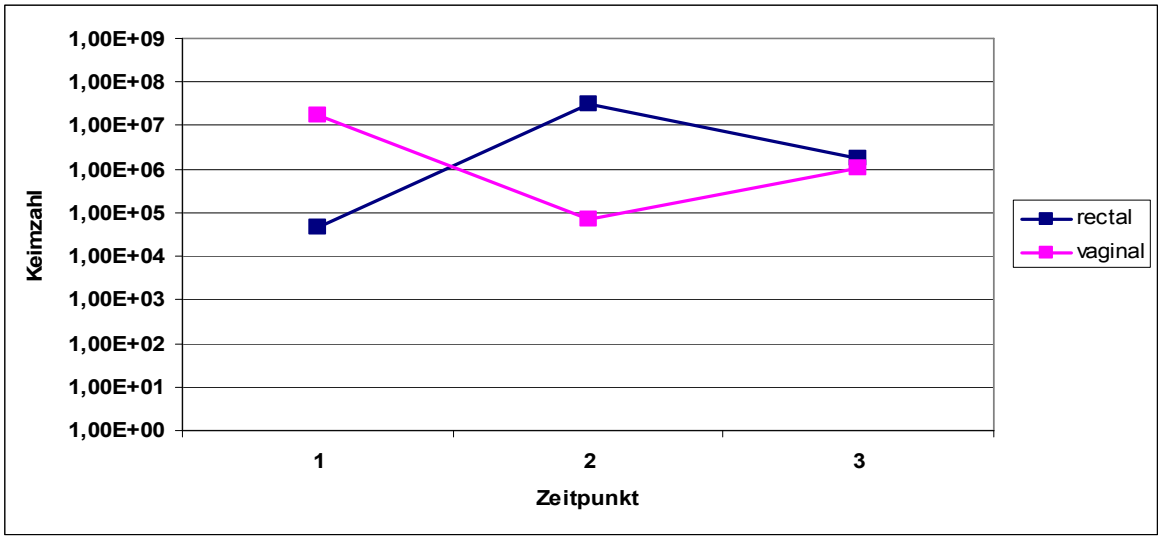

Abb. 4-50: Probandin 43

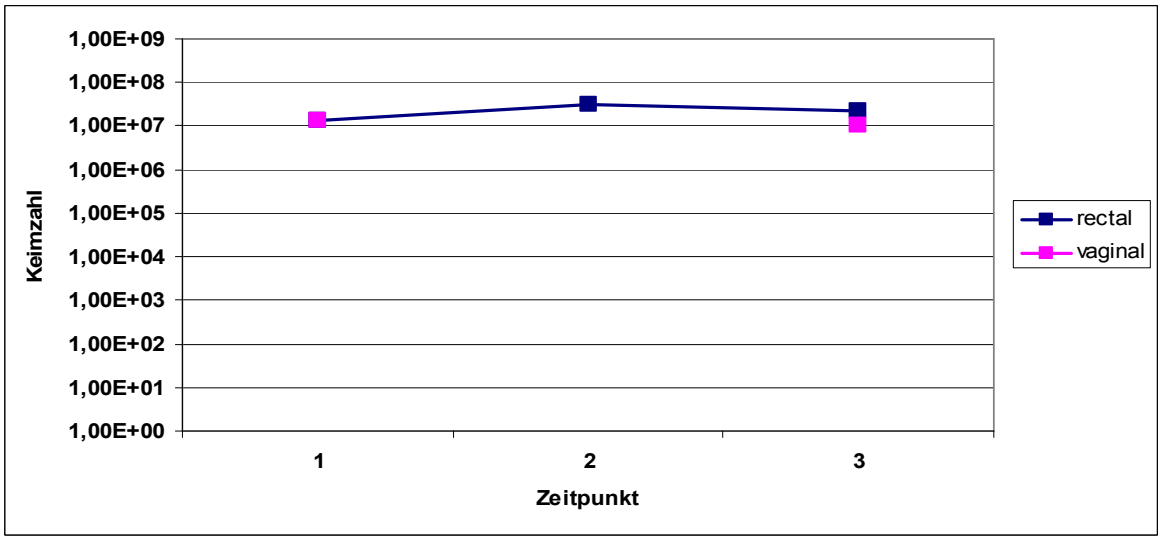

Abb. 4-51: Probandin 44

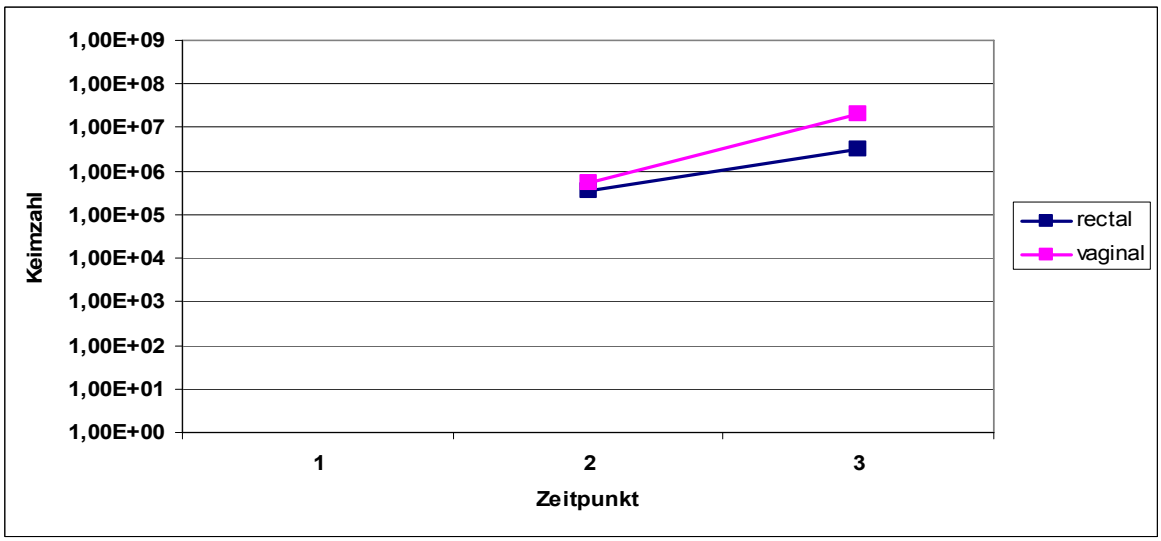

Abb. 4-52: Probandin 45

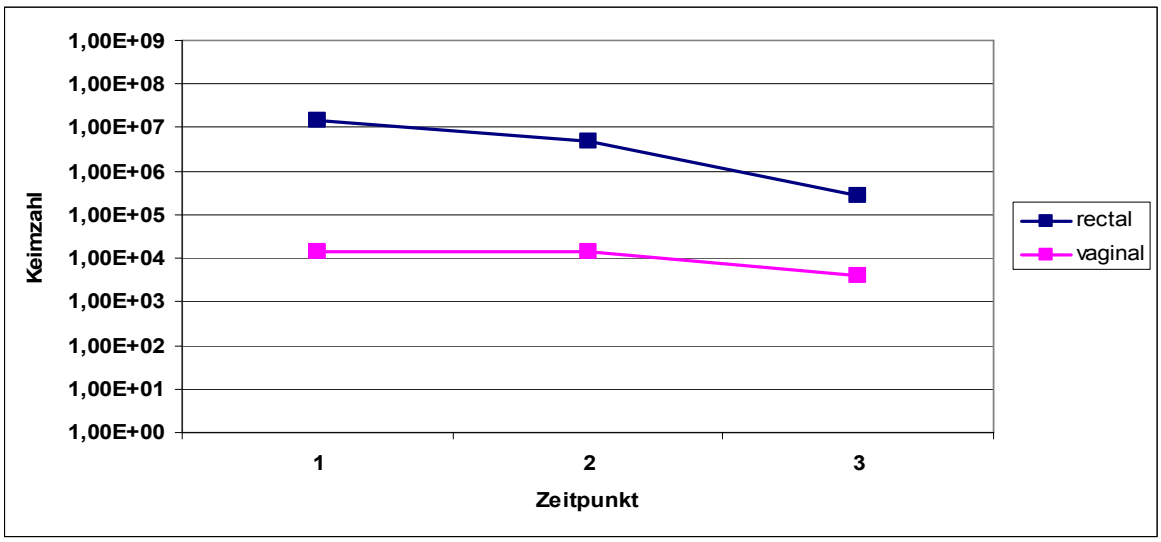

Abb. 4-53: Probandin 46

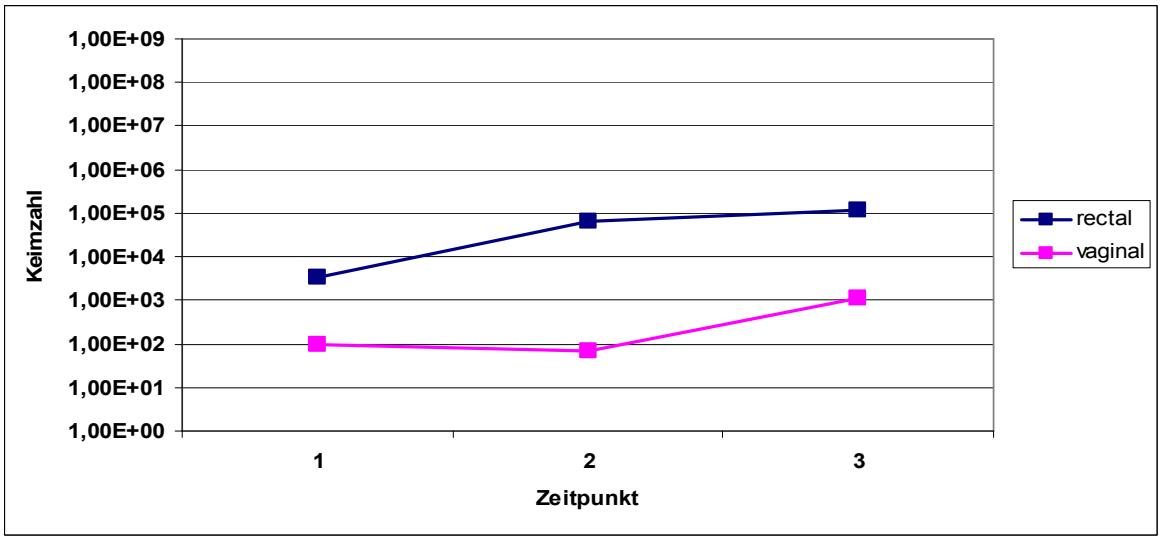

Abb. 4-54: Probandin 47

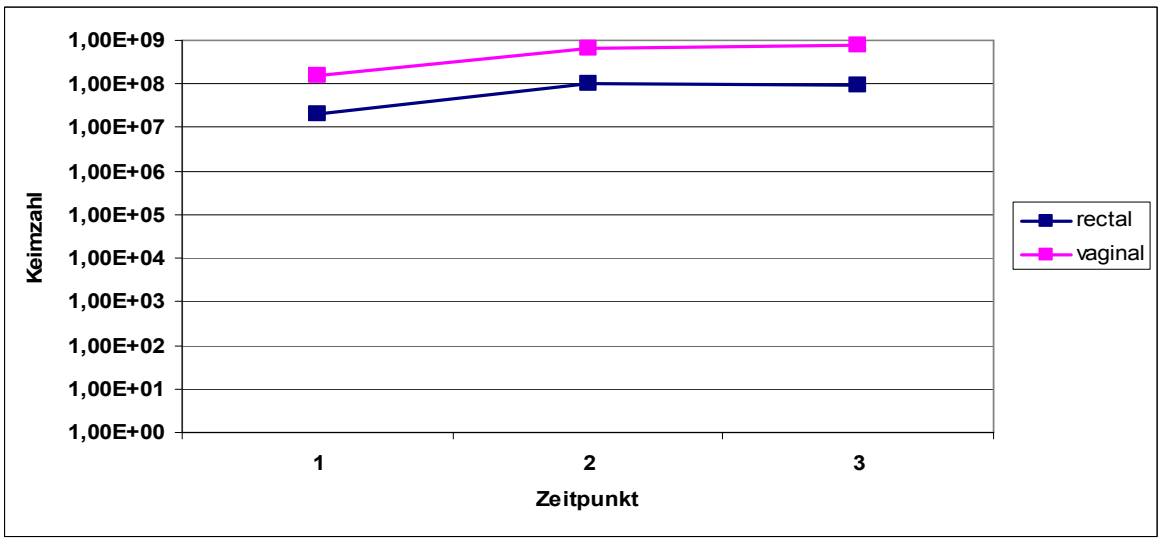

Abb. 4-55: Probandin 50

4.2. Molekularbiologische Ergebnisse

4.2.1. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die isolierten DNA wurde nach Walter et al., 2001, mit den Primern Lac-1f und Lac-2r-GC eine PCR durchgeführt. Diese Amplikons dienten als Basis für eine DGGE, die mit einem Gradienten von 35% - 55% bei 70 Volt und für 16 Stunden durchgeführt wurde. Da Voruntersuchungen nur spärliche Ergebnisse lieferten wurde die Zahl der PCR-Zyklen von 30 auf 35 erhöht um die Sensitivität der PCR zu erhöhen.

Da der Großteil der Banden nicht den Referenzstämmen zugeordnet werde konnten, wurden repräsentative Banden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mittels PCR mit den Primern Lac1-f und Lac2-r amplifiziert. (WALTER et al., 2001)

Ein Teil dieser Produkte wurde mit dem PCRExtract Mini Kit von 5PRIME vor der Sequenzierung gereinigt, der andere Teil wurde direkt an die Firma Eurofins MWG/Operon gesandt und im Zuge des Sequenzierprozesses gereinigt.

Die Sequenzen wurden im Fastaformat über http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast mittels folgenden Einstellungen identifiziert: Database: Others; Optimize: Highly similar sequences (megablast).
Die identifizierten Sequenzen wurden im Anhang 9.3 beigefügt.

Folgende Referenzstämme (*Lactobacillus*-Typstämme) wurden für den Marker der DGGE verwendet.

Tab. 4-2: Referenzstäme für DGGE-Marker

Code	Genus	Spezies	Stammbezeichnung
Lb 3	*Lactobacillus*	*gasseri*	DSM 20243, ATCC 33323
Lb 5	*Lactobacillus*	*johnsonii*	LMG 9436
Lb 6	*Lactobacillus*	*crispatus*	DSM 20584, ATCC 33820
Lb 23	*Lactobacillus*	*plantarum*	DSM 20174, ATCC 14917
Lb 99	*Lactobacillus*	*jensenii*	DSM 20557, ATCC 25258
Lb 192	*Lactobacillus*	*paracasei*	LMG 13087
Lb 197	*Lactobacillus*	*rhamnosus*	LMG 6400
Lb 257	*Lactobacillus*	*iners*	LMG 19914

Die DGGE-Gele wurden mittels der Software Bionumerics Version 6.5 ausgewertet. Die Referenzgele der DGGE für die Analyse mittels der Bionumerics Software wurden in Anhang 1 beigefügt.

4.2.2. Ergebnisse der Sequenzierung

Tab. 4-3: Ergebnisse der Sequenzierung

Gel:	Bande:	Interne Bezeichnung:	Ergebnisse:	Bezeichnung (Bionumerics):
1	1	I.V.1	*L. cristpatus: 98%* *L. acidophilus: 98%* *L. gallinarum: 98%* *L. helveticus: 98%*	*L. delbrueckii* group I
	2	I.V.2	*L. cristpatus: 98%* *L. acidophilus: 98%* *L. gallinarum: 98%* *L. helveticus: 98%*	*L. delbrueckii* group I
	3	I.V.3	*L. cristpatus: 99%* *L. acidophilus: 99%* *L. gallinarum: 99%* *L. helveticus: 99%*	*L. delbrueckii* group I
	4	I.V.4	*L. vaginalis: 99%*	*L. reuteri* group
	5	I.V.5	*L. vaginalis: 99%*	*L. reuteri* group
	6	I.V.6	*L. vaginalis: 99%*	*L. reuteri* group
	7	I.V.10	*Leuconostoc mesenteroides: 99%* *Leuconostoc pseudomesenteroides: 99%*	*Leuconostoc spp.*
	8	I.V.11	*L. cristpatus: 99%* *L. acidophilus: 99%* *L. gallinarum: 99%* *L. helveticus: 99%*	*L. delbrueckii* group I
	9	I.V.13	*L. curvatus: 99%* *L. graminis: 99%* *L. sakei: 99%* *Lactococcus lactis: 98%*	*L. sakei* group, *Lactococcus lactis*
	10	I.V.14	*Carnobacterium divergens: 98%* *Carnobacterium maltaromaticum: 98%* *Carnobacterium viridans: 98%*	*Carnobacterium spp.*
2	1	I.H.2	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	2	I.H.4	*L. curvatus: 99%* *L. graminis: 99%* *L. sakei: 99%* *Lactococcus lactis: 99%*	*L. sakei* group, *Lactococcus lactis*
	3	I.H.5	*Weisella ciberia: 98%* *Weisella confusa: 98%*	*Weisella spp.*
	4	I.H.6	*L. sakei: 100%*	*L. sakei* group
	5	I.H.7	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	6	I.H.8	*Leuconostoc mesenteroides: 100%* *Leuconostoc pseudomesenteroides: 100%*	*Leuconostoc spp.*
	7	I.H.9	*L. casei:100%* *L. paracasei: 100%* *Lactococcus lactis: 100%*	*L. casei* group, *Lactococcus lactis*
3	1	IIb.V.1	*Staphylococcus equorum: 99%* *Planomicrobium okeanokoites: 99%*	*Staphylococcus equorum,* *Planomicrobium okeanokoites*
	2	II.V.1	*Staphylococcus xylosus: 99%*	*Staphylococcus sp.*

Gel:	Bande:	Interne Bezeichnung:	Ergebnisse:	Bezeichnung (Bionumerics):
3	3	IIb.V.2	*L. sakei: 99%* *L. curvatus: 99%* *L. graminis: 99%*	*L. sakei* group
	4	IIb.V.3	*L. sakei: 98%* *L. curvatus: 98%* *L. graminis: 98%*	*L. sakei* group
	5	II.V.2	*L. curvatus: 99%* *L. sakei: 99%* *L. graminis: 99%*	*L. sakei* group
	6	II.V.3	*L. sakei: 99%*	*L. sakei* group
4	1	II.H.1	*Leuconostoc mesenteroides: 98%* *Leuconostoc pseudomesenteroides: 98%*	*Leuconostoc spp.*
	2	II.H.2	*Leuconostoc gasicomitatum: 99%* *Leuconostoc carnosum: 99%*	*Leuconostoc spp.*
5	1	III.V.1	*Leuconostoc lactis: 98%*	*Leuconostoc lactis*
	2	III.V.2	*Leuconostoc lactis: 98%* *Leuconostoc citreum: 98%* *Leuconostoc garlicum: 98%* *Lactococcus lactis: 98%* *L. parabuchnerii: 98%* *L. delbrueckii lactis: 98%*	*Leuconostoc spp.,* *Lactococcus sp.,* *L. buchnerii* group, *L. delbrueckii* group
	3	III.V.4	*Leuconostoc lactis: 99%* *Leuconostoc citreum: 99%* *Leuconostoc garlicum: 99%* *L. parabuchneri: 99%*	*Leuconostoc spp.,* *L. buchnerii* group
	4	III.V.5	*Leuconostoc lactis: 98%* *Leuconostoc garlicum: 98%*	*Leuconostoc spp.*
	5	III.V.6	*Leuconostoc citreum: 100%*	*Leuconostoc sp.*
6	1	III.H.2	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	2	III.H.3	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	3	III.H.4	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	4	III.H.4	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
7	1	IV.V.1	*L. delbrueckii lactis: 99%* *L. delbrueckii delbrueckii: 99%* *L. delbrueckii bulgaricus: 99%*	*L.delbrueckii*
	2	IV.V.3	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	3	IV.V.4	*L. sakei: 99%*	*L. sakei* group
	4	IV.V.5	*L. sakei: 99%*	*L. sakei* group
	5	IV.V.6	*L. sakei: 99%*	*L. sakei* group
	6	IV.V.7	*Leuconostoc gasicomitatum: 99%* *Leuconostoc carnosum: 99%*	*Leuconostoc spp.*
	7	IV.V.8	*Leuconostoc mesenteroides: 100%*	*Leuconostoc spp.*
8	1	IV.H.1	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	2	IV.H.2	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis

Gel:	Bande:	Interne Bezeichnung:	Ergebnisse:	Bezeichnung (Bionumerics):
8	3	IV.H.3	*Leuconostoc mesenteroides: 99%* *Leuconostoc pseudomesenteroides: 99%*	*Leuconostoc* spp.
	4	IV.H.6	*Morganella morganii: 100%*	*Morganella morganii*
9	1	V.V.4	*L. casei: 98%* *L. paracasei: 98%*	*L. casei* group
	2	V.V.5	*L. casei: 99%* *L. paracasei: 99%*	*L. casei* group
	3	V.V.10	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	4	V.V.11	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	5	V.V.12	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	6	V.V.13	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
10	1	V.H.2	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	2	V.H.4	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	3	V.H.5	*L. iners: 98%*	*L. iners*
	4	V.H.6	*L. iners: 98%*	*L. iners*
	5	V.H.7	*L. iners: 99%*	*L. iners*
	6	V.H.8	*L. cristpatus: 99%* *L. acidophilus: 99%* *L. gallinarum: 99%* *L. helveticus: 99%*	*L. delbrueckii* group I
11	1	VI.V.1	*L. cristpatus: 99%* *L. acidophilus: 99%* *L. gallinarum: 99%* *L. helveticus: 99%*	*L. delbrueckii* group I
	2	VI.V.2	*Leuconostoc mesenteroides: 100%*	*Leuconostoc spp.*
12	1	VI.V.3	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	2	VI.V.4	*L. sakei: 98%*	*L. sakei* group
13	1	VII.V.1	*L. salivarus: 99%*	*L. salivarus* group
	2	VII.V.2	*L. salivarus: 99%*	*L. salivarus* group
	3	VII.V.3	*L. salivarus: 99%*	*L. salivarus* group
	4	VII.V.5	*L. rhamnosus: 98%*	*L. casei* group
	5	VII.V.6	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	6	VII.V.7	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	7	VII.V.8	*L. johnsonii: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	8	VII.V.9	*L. paracasei: 99%*	*L. casei* group

Gel:	Bande:	Interne Bezeichnung:	Ergebnisse:	Bezeichnung (Bionumerics):
13	9	VII.V.11	*L. delbrueckii indicus: 98%* *L. delbrueckii bulgaricus: 98%*	*L. delbrueckii*
	10	VII.V.12	*L. delbrueckii indicus: 99%* *L. delbrueckii bulgaricus: 99%* *L. delbrueckii delbrueckii: 99%* *L. delbrueckii lactis: 99%*	*L. delbrueckii*
	11	VII.V.13	*L. delbrueckii indicus: 99%* *L. delbrueckii bulgaricus: 99%* *L. delbrueckii delbrueckii: 99%* *L. delbrueckii lactis: 99%*	*L. delbrueckii*
	12	VII.V.14	*L. salivarus: 99%*	*L. salivarus* group
14	1	VII.H.1	Kein Ergebnis	kein Ergebnis
	2	VII.H.2	*L. salivarus: 100%*	*L. salivarus* group
	3	VII.H.4	*L. sakei: 99%*	*L. sakei* group
	4	VII.H.7	*L. sakei: 99%*	*L. sakei* group
15	1	VIII.V.3	*L. casei: 99%* *L. paracasei: 99%*	*L. casei* group
16	1	VIII.H.1	*Leuconostoc mesenteroides: 98%* *Leuconostoc pseudomesenteroides: 98%*	*Leuconostoc spp.*
	2	VIII.H.2	*Leuconostoc mesenteroides: 99%* *Leuconostoc pseudomesenteroides: 99%*	*Leuconostoc spp.*
	3	VIII.H.3	*Leuconostoc mesenteroides: 99%* *Leuconostoc pseudomesenteroides: 99%*	*Leuconostoc spp.*
	4	VIII.H.5	*L. casei: 99%* *L. paracasei: 99%*	*L. casei* group
18	1	IX.H.2	*L. salivarus: 99%*	*L. salivarus* group
	2	IX.H.3	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	3	IX.H.4	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	4	IX.H.6	*L. iners: 99%*	*L. iners*
	5	IX.H.12	*L. iners: 98%*	*L. iners*
19	1	X.V.3	*L. cristpatus: 99%* *L. acidophilus: 99%* *L. gallinarum: 99%* *L. helveticus: 99%*	*L. delbrueckii* group I
	2	X.V.9	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	3	X.V.10	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
	4	X.V.11	*L. iners: 98%*	*L. iners*
	5	X.V.12	*L. iners: 98%*	*L. iners*
20	1	X.H.3	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	2	X.H.4	*L. johnsonii: 98%* *L. gasseri: 98%*	*L. delbrueckii* group II

Gel:	Bande:	Interne Bezeichnung:	Ergebnisse:	Bezeichnung (Bionumerics):
21	1	XI.V.1	*L. johnsonii: 98%* *L. gasseri: 98%*	*L. delbrueckii* group II
	2	XI.V.2	*L. ruminis: 99%*	*L. salivarus* group
22	1	XI.H.1	*L. mucosae: 99%*	*L. reuteri* group
	2	XI.H.2	*L. mucosae: 99%*	*L. reuteri* group
	3	XI.H.3	*L. mucosae: 99%*	*L. reuteri* group
	4	XI.H.4	*L. mucosae: 98%*	*L. reuteri* group
	5	XI.H.5	*L. mucosae: 99%*	*L. reuteri* group
	6	XI.H.6	*Leuconostoc citreum: 98%* *Leuconostoc garlicum: 98%* *Lactococcus lactis: 98%* *L. parabuchnerii: 98%* *L. casei: 98%*	*Leuconostoc spp.,* *L. casei* group *L. buchneri* group
	7	XI.H.7	*Leuconostoc garlicum: 98%* *Lactococcus lactis: 98%* *L. parabuchnerii: 98%* *L. delbrueckii lactis: 98%*	*Leuconostoc spp.,* *L. casei* group, *L. buchneri* group, *L. delbruecki* group
	8	XI.H.9	*L. cristpatus: 99%* *L. acidophilus: 99%* *L. gallinarum: 99%* *L. helveticus: 99%*	*L. delbrueckii* group I
23	1	XII.V.3	*L. casei: 99%* *L. paracasei: 99%*	*L. casei* group
	2	XII.V.4	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	3	XII.V.5	*Leuconostoc garlicum: 98%* *Lactococcus lactis: 98%* *L. parabuchnerii: 98%* *L. delbrueckii lactis: 98%*	*Leuconostoc spp.,* *L. casei* group, *L. buchneri* group, *L. delbruecki* group
24	1	XII.H.1	*L. johnsonii: 98%* *L. gasseri: 98%*	*L. delbrueckii* group II
	2	XII.H.2	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
25	1	XIII.V.1	*L. johnsonii: 98%* *L. gasseri: 98%*	*L. delbrueckii* group II
	2	XIII.V.2	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	3	XIII.V.3	*L. johnsonii: 98%* *L. gasseri: 98%*	*L. delbrueckii* group II
	4	XIII.V.4	*L. johnsonii: 99%* *L. gasseri: 99%*	*L. delbrueckii* group II
	5	XIII.V.5	*Aerococcus urinae: 99%*	*Aerococcus sp.*
	6	XIII.V.6	*L. curvatus: 99%* *L. sakei: 99%* *L. graminis: 99%* *Lactococcus lactis: 99%*	*L. sakei* group, *Lactococus sp.*
	7	XIII.V.7	*Leuconostoc mesenteroides: 100%*	*Leuconostoc spp.*

4.2.3. Ergebnisse der DGGE ausgewertet durch Bionumerics

Tab. 4-4: Ergebnisse der Gesamtauswertung durch Bionumerics -Tag 0

	Zeitpunkt 1	Rektal	Vaginal	Gesamt
***L. delbrueckii* Gruppe**	*L. crispatus*	14	19	33
	L. delbrueckii group 1	19	12	31
	L. delbrueckii group 2	0	0	0
	L. delbrueckii	22	24	46
	L. gasseri	21	25	46
	L. iners	0	2	2
	L. jensenii	13	13	26
	L. johnsonii	2	2	4
***L. sakei* Gruppe**	*L. sakei* group	19	24	43
	L. sakei	0	5	5
***L. casei* Gruppe**	*L. rhamnosus*	3	3	6
	L. paracasei	0	1	1
	L. rhamnosus/L. paracasei 3	24	25	49
	L. casei group	7	4	11
***L. plantarum* Gruppe**	*L. plantarum*	17	12	29
***L. reuteri* Gruppe**	*L. mucosae*	0	0	0
	L. vaginalis	0	0	0
***L. salivarius* Gruppe**	*L. ruminis*	1	0	1
	L. salivarius	0	0	0
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	*L. sakei* group *oder* *Lactococcus sp.*	10	9	19
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	*L. parabuchneri oder* *Leuconostoc spp.*	2	2	4
Ordnung *Lactobacilliales*	*Weissella spp.*	2	0	2
	Leuconostoc spp. oder *Lactococcus spp. oder* *Lactobacillus spp.*	11	12	23
	Leuconostoc lactis	3	1	4
	Leuconostoc citreum	8	8	16
	Leuconostoc spp.	3	2	5
	Carnobacterium spp.	5	8	13
Class *Bacilli*	*Staphylococcus spp.*	2	3	5
Ordnung Bacillales	*Staphylococcus spp. oder* *Planomicrobium spp.*	1	6	7
Class *Gammaproteobacteria*	*Morganella morganii*	0	1	1
Nicht identifizierbar	Not identified by sequencing	0	1	1

Tab. 4-5: Ergebnisse der Gesamtauswertung durch Bionumerics -Tag 14

	Zeitpunkt 2	Rektal	Vaginal	Gesamt
***L. delbrueckii* Gruppe**	*L. crispatus*	20	14	34
	L. delbrueckii group 1	19	16	35
	L. delbrueckii group 2	0	0	0
	L. delbrueckii	24	24	48
	L. gasseri	28	27	55
	L. iners	0	1	1
	L. jensenii	15	19	34
	L. johnsonii	2	1	3
***L. sakei* Gruppe**	*L. sakei* group	18	26	44
	L. sakei	3	4	7
***L. casei* Gruppe**	*L. rhamnosus*	4	2	6
	L. paracasei	1	1	2
	L. rhamnosus/L. paracasei 3	22	27	49
	L. casei group	3	7	10
***L. plantarum* Gruppe**	*L. plantarum*	14	17	31
***L. reuteri* Gruppe**	*L. mucosae*	0	0	0
	L. vaginalis	0	1	1
***L. salivarius* Gruppe**	*L. ruminis*	1	0	1
	L. salivarius	2	1	3
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	*L. sakei* group *oder* *Lactococcus sp.*	11	7	18
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	*L. parabuchneri oder* *Leuconostoc spp.*	5	1	6
Ordnung *Lactobacilliales*	*Weissella spp.*	0	1	1
	Leuconostoc spp. oder *Lactococcus spp. oder* *Lactobacillus spp.*	7	14	21
	Leuconostoc lactis	3	0	3
	Leuconostoc citreum	10	12	22
	Leuconostoc spp.	1	1	2
	Carnobacterium spp.	5	5	10
Class* *Bacilli	*Staphylococcus spp.*	2	0	2
Ordnung Bacillales	*Staphylococcus spp. oder* *Planomicrobium spp.*	3	2	5
Class *Gammaproteobacteria*	*Morganella morganii*	0	0	0
Nicht identifizierbar	Not identified by sequencing	0	1	1

Tab. 4-6: Ergebnisse der Gesamtauswertung durch Bionumerics -Tag 28

	Zeitpunkt 3	Rektal	Vaginal	Gesamt
***L. delbrueckii* Gruppe**	*L. crispatus*	13	18	31
	L. delbrueckii group 1	13	16	29
	L. delbrueckii group 2	4	0	4
	L. delbrueckii	12	25	37
	L. gasseri	29	27	56
	L. iners	2	2	4
	L. jensenii	14	19	33
	L. johnsonii	3	1	4
***L. sakei* Gruppe**	*L .sakei group*	19	21	40
	L. sakei	4	4	8
***L. casei* Gruppe**	*L. rhamnosus*	3	1	4
	L. paracasei	1	0	1
	L. rhamnosus/L. paracasei 3	26	27	53
	L. casei group	3	7	10
***L. plantarum* Gruppe**	*L. plantarum*	16	14	30
***L. reuteri* Gruppe**	*L. mucosae*	0	1	1
	L. vaginalis	0	0	0
***L. salivarius* Gruppe**	*L. ruminis*	0	0	0
	L. salivarius	1	1	2
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	*L. sakei group oder Lactococcus sp.*	9	3	12
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	*L. parabuchneri oder Leuconostoc spp.*	2	2	4
Ordnung *Lactobacilliales*	*Weissella spp.*	0	2	2
	Leuconostoc spp. oder Lactococcus spp. oder Lactobacillus spp.	6	10	16
	Leuconostoc lactis	2	1	3
	Leuconostoc citreum	10	7	17
	Leuconostoc spp.	3	0	3
	Carnobacterium spp.	6	3	9
Class *Bacilli*	*Staphylococcus spp.*	1	0	1
Ordnung Bacillales	*Staphylococcus spp. oder Planomicrobium spp.*	1	1	2
Class Gammaproteobacteria	*Morganella morganii*	0	0	0
Nicht identifizierbar	Not identified by sequencing	0	1	1

Um die Auswertung durch die Software Bionumerics Version 6.5 übersichtlicher darzustellen wurden die identifizierten Lactobacillen-Stämme nach einer Studie von Felis und Dellaglio, 2007, in ihre phylogenetischen Gruppen eingeteilt Innerhalb der *L. delbrueckii* Gruppe wurde für diese Studie aufgrund der Ergebnisse der Sequenzierung eine weitere Unterteilung, in *L. delbruecki* Gruppe 1 und *L. delbruecki* Gruppe *2* getroffen, die allerdings nur der übersichtlicheren Darstellung innerhalb dieser Arbeit dient und von keiner wissenschaftlichen Relevanz ist. Die *L. delbruecki* Gruppe 1 umfasst die Arten L*. cristpatus, L.acidophilus, L. gallinarum, L. helveticus* während die *L. delbruecki* Gruppe 2 die Arten *L. johnsonii* und *L. gasseri* beinhaltet.

Aus demselben Grund wurden durch die Sequenzierung nicht eindeutig identifizierten Arten in Gruppen aufgrund ihrer systematischen Zugehörigkeit getroffen. So wurden diverse *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. *Carnobacterium* spp. und *Weissella* spp. als Gattung Lactobacilliales zusammengefasst. Ebenso wurden eindeutig identifizierte *Staphylococcus* spp. als Klasse *Bacilli* dargestellt und die nicht eindeutig als *Staphylococcus* spp. oder *Planomicrobium* spp. unter ihrer systematischen Ordnung als Bacillales aufgeführt.

Innerhalb der eindeutig identifizierten *Lactobacillus* Arten sind für alle 3 Zeitpunkte in der Gesamtauswertung (rektal und vaginal) *L. gasseri* und *L.delbrueckii* die am häufigsten vertretenen Arten, gefolgt von *L. crispatus, L. plantarum* und *L. jensenii.* Desweiteren konnten *L. rhamnosus*, *L. sakei, L. johnsonii, L. iners* und *L. paracasei* nachgewiesen werden. Vereinzelt traten auch *L. ruminis*, *L. mucosae* und *L. vaginalis auf.* Die Tabellen 4-4 bis 4-6 zeigen das die Verteilung der einzelnen Arten zueinander stabil ist und die Schwankungen innerhalb von 28 Tagen so gering das sie vernachlässigbar sind.

Obwohl die als *L. rhamnosus* / *L. paracasei* identifizierten Banden sehr stark vertreten sind, ist es unmöglich die Verteilung auf *L. rhamnosus* und *L. paracasei* abzuschätzen. Da sie jedoch, nach Felis und Dellaglio, 2007, derselben phylogenetischen Gruppe angehören, wird ihre Dominanz in der grafischen Darstellung der identifizierten phylogenetischen Gruppen sichtbar. (siehe Abb. 4-57 bis Abb.4-65)

Auch innerhalb der „nicht eindeutig als Lactobacillus identifizierten“ Arten, die entweder Vertreter der *L. sakei* Gruppe oder *Lactococcus* sp. bzw. *L. parabuchnerii* oder *Leuconostoc* spp. sind ist die Verteilung eine abzuschätzen. (siehe Abb. 4-57- bis Abb.4-65)

Das Auftreten von anderen Vertretern der Ordnung *Lactobacilliales*, hauptsächlich der Gattung *Leuconostoc* spp. aber auch *Carnobacterium* sp. und *Weissella* sp. konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Die in den Tabellen Abb. 4-4 bis Abb. 4-6 aufgelisteten Ergebnisse wurden zur besseren Übersicht auch graphisch in den Abbildungen Abb.4-57 bis Abb.4-59 zusammengefasst

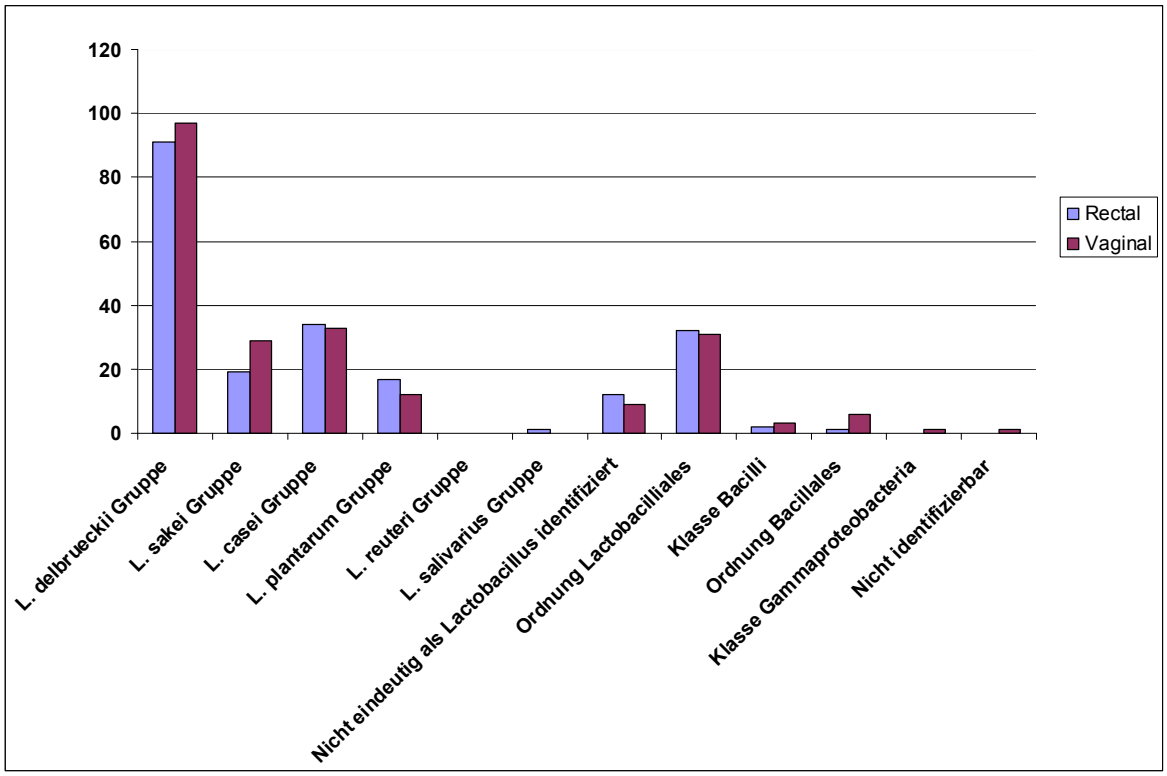

Abb. 4-56: Vergleich der identifizierten Arten der beiden Habitate; Tag 0

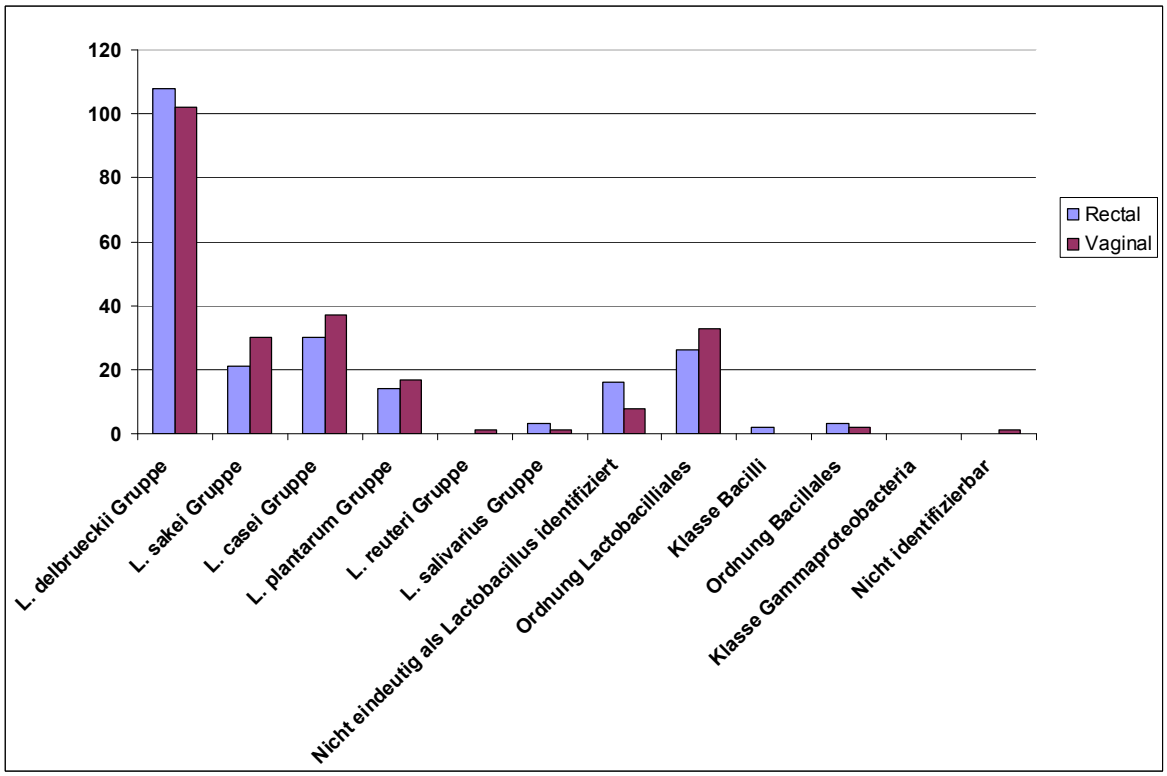

Abb. 4-57:Vergleich der identifizierten Arten der beiden Habitate; Tag 14

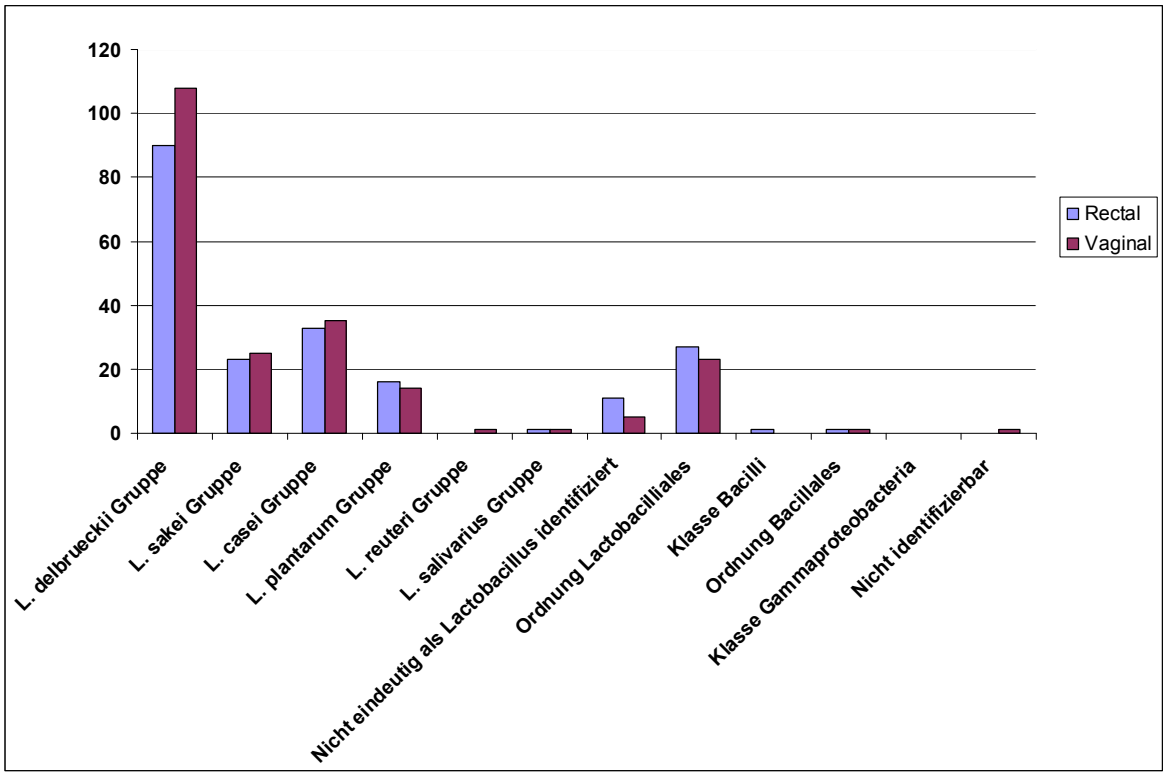

Abb. 4-58: Vergleich der identifizierten Arten der beiden Habitate; Tag 28

Für alle 3 untersuchten Zeitpunkte wurden in der Gesamtauswertung (rektal und vaginal) Vertreter der *L. delbrueckii* Gruppe am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von Vertretern der *L. casei*, *L*. sakei und *L. plantarum* Gruppen. Vereinzelt traten auch Vertreter der Gruppen *L. reuteri* und *L. salivarus* auf. Die Verteilung der Verhältnisse der einzelnen Gruppen zueinander ist stabil und die Schwankungen innerhalb von 28 Tagen so gering das sie vernachlässigbar sind.

Wie bereits oben erwähnt konnte das Auftreten von anderen Vertretern der Ordnung *Lactobacilliales*, hauptsächlich der Gattung *Leuconostoc* aber auch *Carnobacterium* und *Weissella* ebenfalls nachgewiesen werden.

Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse in den Abbildungen Abb.4-60 bis Abb.4-65 nochmals für die verschiedenen Habitate getrennt grafisch dargestellt.

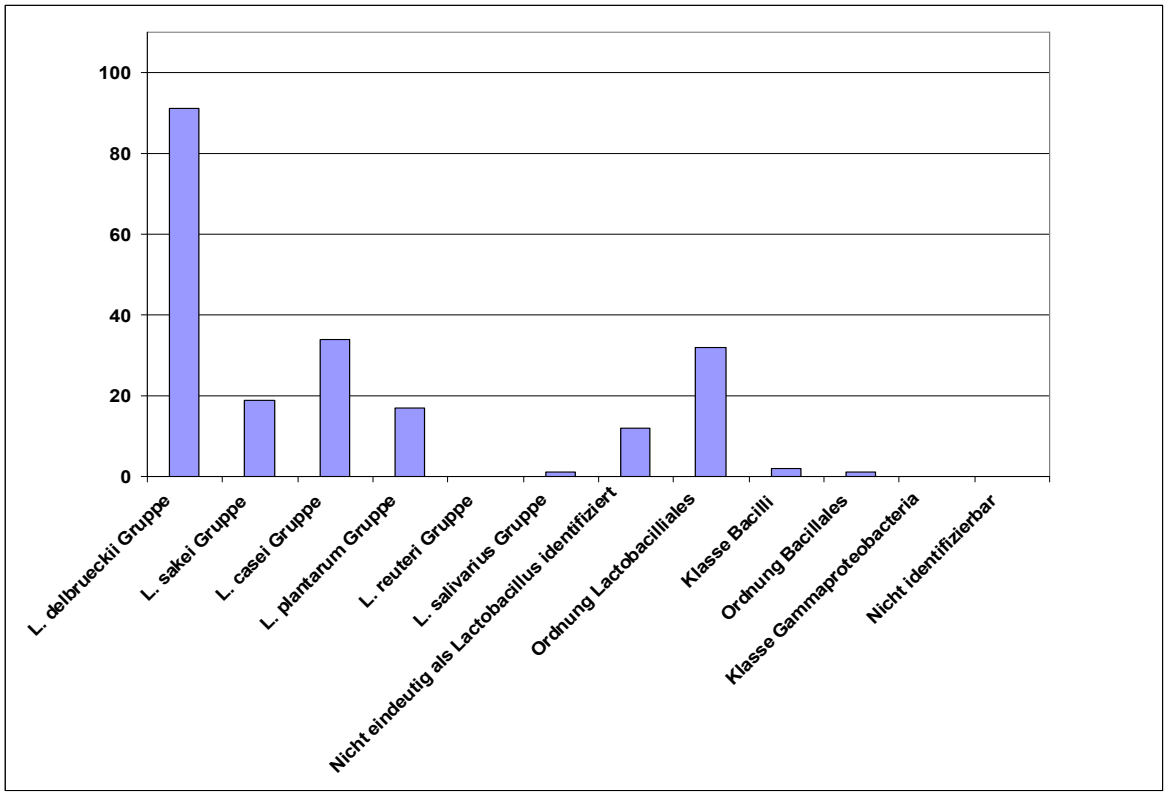

Abb. 4-59: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen Abstriche; Tag 0

Innerhalb der rektalen Abstriche zum Zeitpunkt 1 dominieren die Vertreter der *L. delbrueckii* Gruppe gefolgt von Vertretern der *L. casei, L. sakei und L. plantarum* Gruppen. Vereinzelt traten Vertreter der *L. salivarus* Gruppe auf. Zum Zeitpunkt 1 gab es keine Hinweise auf die Anwesenheit von Vertretern der *L. reuteri* Gruppe.

Wie aus Tab. 4-4 hervorgeht wurden insgesamt 12 Banden nicht eindeutig der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet, 10 dieser Banden gehören entweder der *L. sakei* Gruppe an oder es handelt sich um *Lactococcus spp.* Bei den anderen Beiden handelt es sich entweder um *L. parabuchneri* oder *Leuconostoc spp.*

Insgesamt wurden 32 Vertreter der Ordnung *Lactobacilliales* zugeordnet, wobei zu diesem Zeitpunkt 14 eindeutig als *Leuconostoc spp.*, 2 als *Weisella spp*. und 5 als *Carnobactium spp*. identifiziert wurden. Bei den übrigen 11 Arten handelt es sich entweder um *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. oder *Lactobacillus* spp.

Zuletzt wurden 2 Banden eindeutig als *Staphylococcus spp.* identifiziert und eine weitere als entweder *Staphylococcus sp*. oder *Planomicrobium sp.*

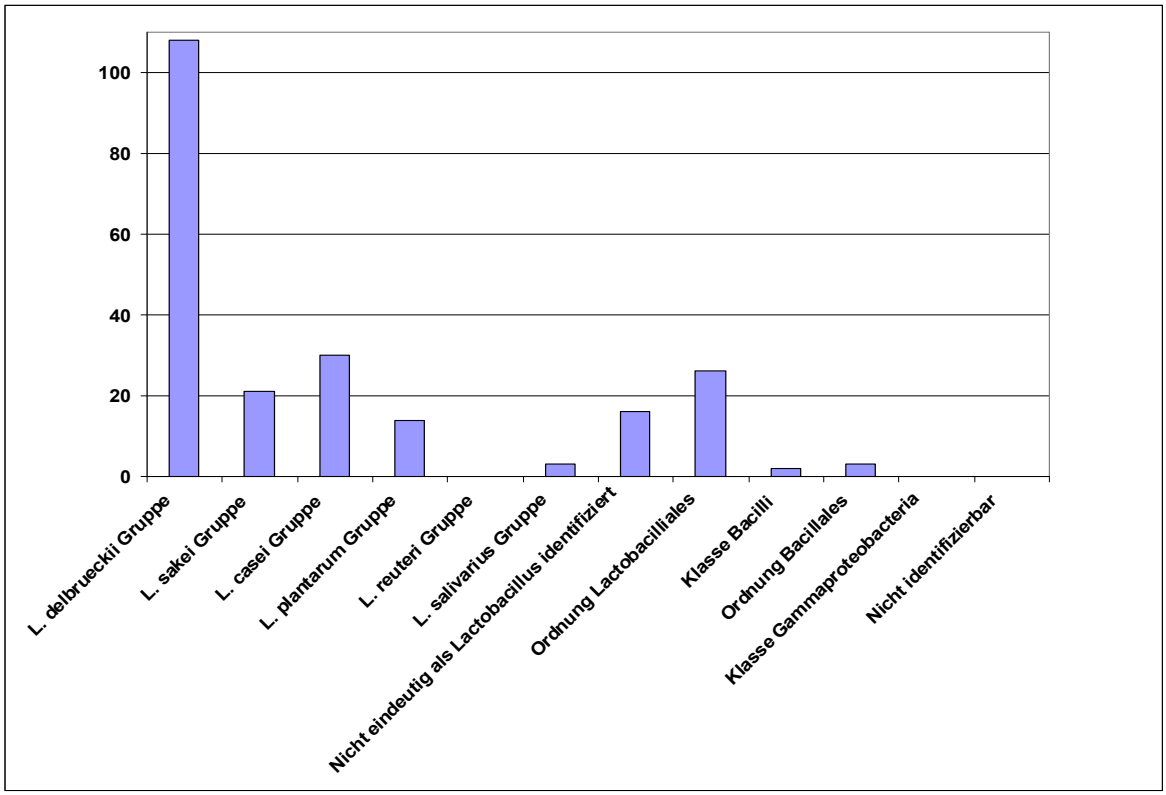

Abb. 4-60: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen Abstriche; Tag 14

Innerhalb der rektalen Abstriche zum Zeitpunkt 2 dominieren die Vertreter der *L. delbrueckii* Gruppe gefolgt von Vertretern der *L. casei, L. sakei und L. plantarum* Gruppen. Vereinzelt traten Vertreter der *L. salivarus* Gruppe auf. Auch zum Zeitpunkt 2 gab es keine Hinweise auf die Anwesenheit von Vertretern der *L. reuteri* Gruppe.

Es wurden insgesamt 16 Banden nicht eindeutig der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet (siehe Tab.4-5). Elf dieser Banden gehören entweder der *L. sakei* Gruppe an oder es handelt sich um *Lactococcus spp.* Bei den anderen 5 handelt es sich entweder um *L. parabuchneri* oder *Leuconostoc spp..*

Insgesamt wurden 26 Vertreter der Ordnung *Lactobacilliales* zugeordnet, wobei zu diesem Zeitpunkt 14 eindeutig als *Leuconostoc spp.*, und 5 als *Carnobactium spp*. identifiziert wurden. Bei den übrigen 7 Arten handelt es sich entweder um *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. oder *Lactobacillus* spp. (siehe Tab.4-5)

Zudem wurden 2 Banden eindeutig als *Staphylococcus spp.* identifiziert und drei weitere als entweder *Staphylococcus sp*. oder *Planomicrobium sp.* (siehe Tab.4-5)

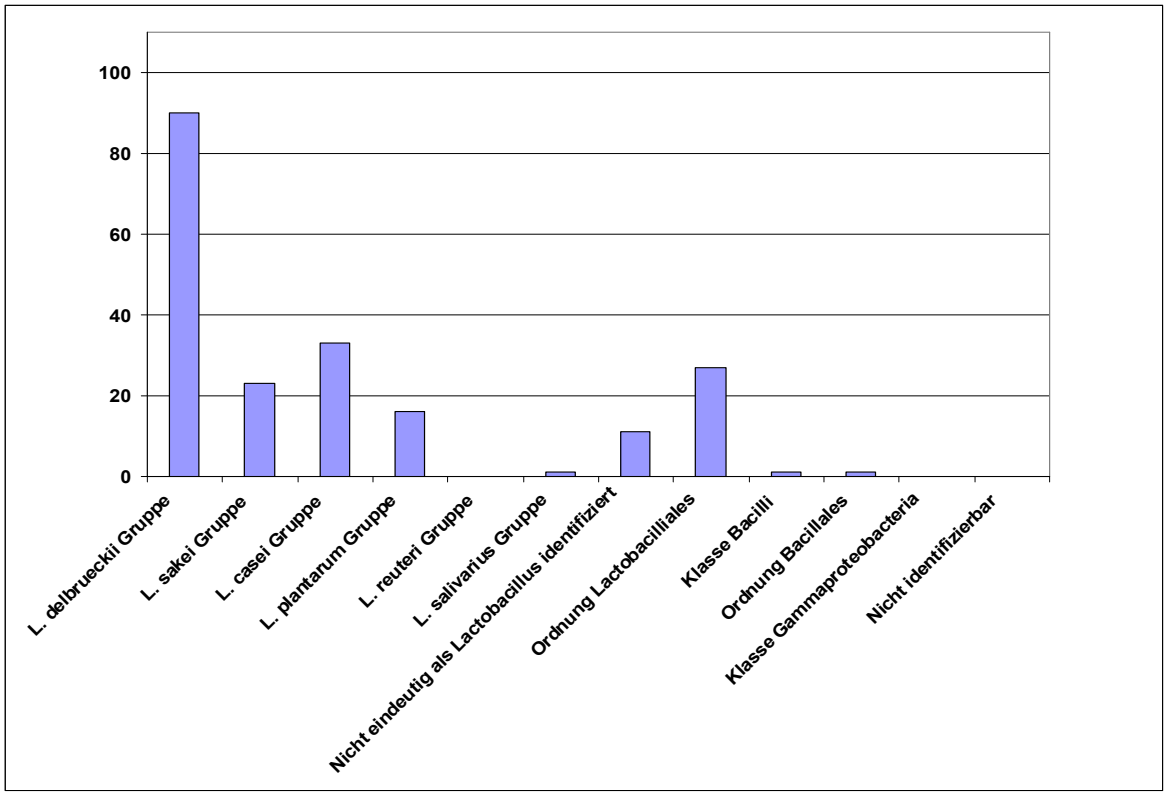

Abb. 4-61: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen Abstriche; Tag 28

Innerhalb der rektalen Abstriche zum Zeitpunkt 3 dominieren die Vertreter der *L. delbrueckii* Gruppe gefolgt von Vertretern der *L. casei, L. sakei und L. plantarum* Gruppen. Vereinzelt traten Vertreter der *L. salivarus* Gruppe auf. Zum Zeitpunkt 2 gab es ebenfalls keine Hinweise auf die Anwesenheit von Vertretern der *L. reuteri* Gruppe.

Es wurden insgesamt 11 Banden nicht eindeutig der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet, 9 dieser Banden gehören entweder der *L. sakei* Gruppe an oder es handelt sich um *Lactococcus spp.* Bei den anderen Beiden handelt es sich entweder um *L. parabuchneri* oder *Leuconostoc spp*. (siehe Tab.4-6)

Insgesamt wurden 27 Vertreter der Ordnung *Lactobacilliales* zugeordnet, wobei zu diesem Zeitpunkt 15 eindeutig als *Leuconostoc spp.*, und 6 als *Carnobactium spp*. identifiziert wurden. Bei den übrigen 6 Arten handelt es sich entweder um *Leuconostoc spp., Lactococcus spp.* oder *Lactobacillus spp.* (siehe Tab.4-6)

Eine Bande wurde eindeutig als *Staphylococcus* sp. identifiziert, eine weitere als entweder *Staphylococcus* sp. oder *Planomicrobium* sp. (siehe Tab.4-6)

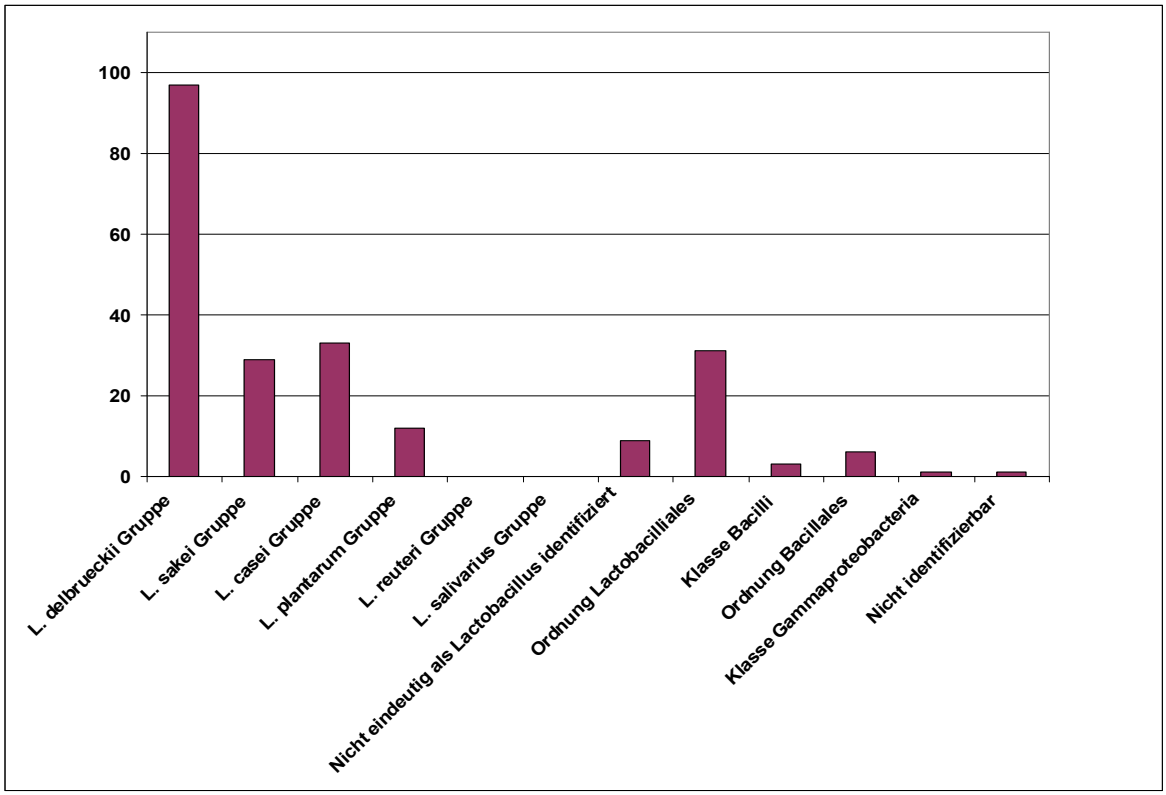

Abb. 4-62: Verteilung der identifizierten Arten der vaginalen Abstriche; Tag 0

Innerhalb der vaginalen Abstriche zum Zeitpunkt 1 dominieren die Vertreter der *L. delbrueckii* Gruppe gefolgt von Vertretern der *L. casei, L. sakei und L. plantarum* Gruppen. Vereinzelt traten Vertreter der *L. salivarus* Gruppe auf. Zum Zeitpunkt 1 gab es ebenfalls keine Hinweise auf die Anwesenheit von Vertretern der *L. reuteri* oder *L. salivarius* Gruppe.

Es wurden insgesamt 11 Banden nicht eindeutig der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet. (siehe Tab. 4-4) Neun dieser Banden gehören entweder der *L. sakei* Gruppe an oder es handelt sich um *Lactococcus spp.* Bei den anderen Beiden handelt es sich entweder um *L. parabuchneri* oder *Leuconostoc spp.*

Insgesamt wurden 31 Vertreter der Ordnung *Lactobacilliales* zugeordnet, wobei zu diesem Zeitpunkt 11 eindeutig als *Leuconostoc spp.*, und 8 als *Carnobactium spp*. identifiziert wurden. Bei den übrigen 12 Arten handelt es sich entweder um *Leuconostoc spp. , Lactococcus spp.* oder *Lactobacillus spp.* (siehe Tab. 4-4)

Zuletzt wurden 3 Banden eindeutig als *Staphylococcus* sp. identifiziert und 6 weitere als entweder *Staphylococcus* sp. oder *Planomicrobium* sp. (siehe Tab. 4-4)

Im Gegensatz zu den rektalen Abstrichen des Zeitpunkt 1 trat hier einmalig *Morganella Morganii* als Vertreter der Gram-negativen Gammaproteobacterien auf. (siehe Tab. 4-4)

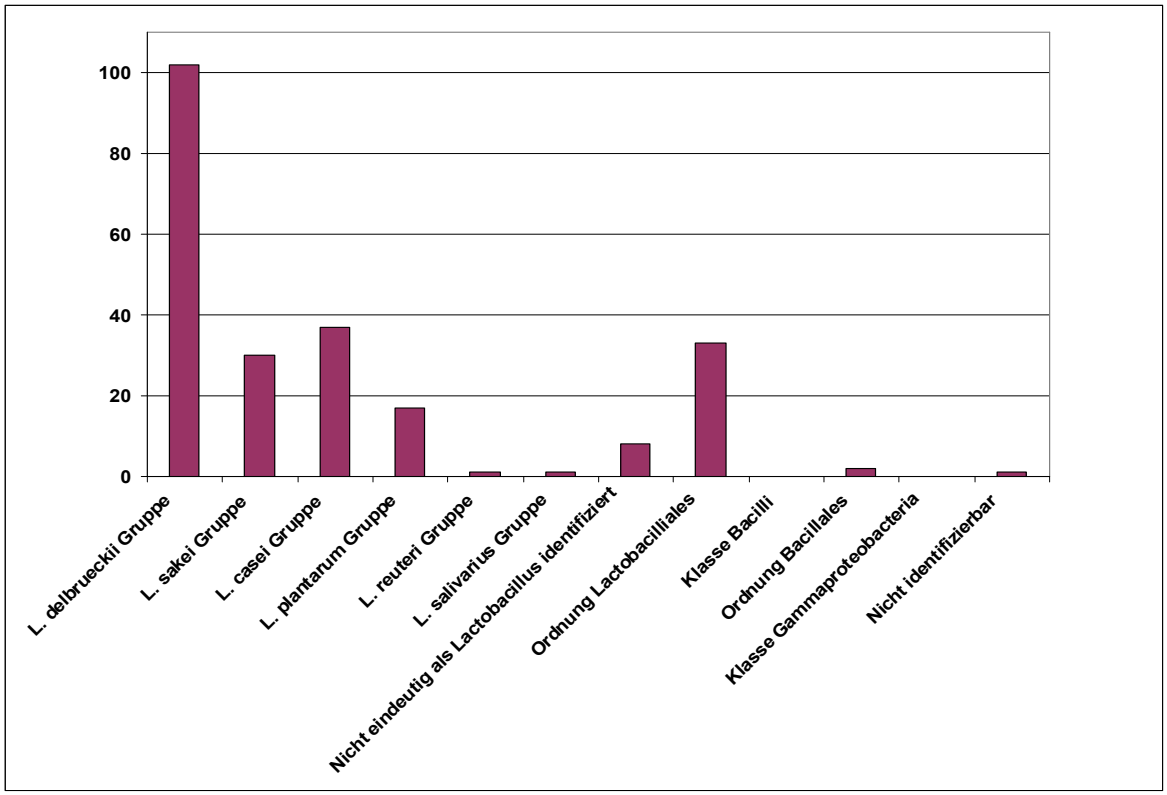

Abb. 4-63: Verteilung der identifizierten Arten der vaginalen Abstriche; Tag 14

Innerhalb der vaginalen Abstriche zum Zeitpunkt 2 dominieren die Vertreter der *L. delbrueckii* Gruppe gefolgt von Vertretern der *L. casei, L. sakei und L. plantarum* Gruppen. Vereinzelt traten Vertreter der *L. salivarus* Gruppe auf. Zum Zeitpunkt 2 gab es eindeutige Hinweise auf die Anwesenheit von Vertretern der *L. reuteri* Gruppe und der *L. salivarius* Gruppe.

Es wurden insgesamt 8 Banden nicht eindeutig der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet, 7 dieser Banden gehören entweder der *L. sakei* Gruppe an oder es handelt sich um *Lactococcus spp.* Bei einer handelt es sich entweder um *L. parabuchneri* oder *Leuconostoc spp.* (siehe Tab. 4-5)

Insgesamt wurden 33 Vertreter der Ordnung *Lactobacilliales* zugeordnet, wobei zu diesem Zeitpunkt 13 eindeutig als *Leuconostoc spp.*, 5 als *Carnobactium spp*. und eine als *Weisella* spp. identifiziert wurden. Bei den übrigen 14 Arten handelt es sich entweder um *Leuconostoc spp. , Lactococcus spp.* oder *Lactobacillus spp.* (siehe Tab. 4-5)

Zuletzt wurden 2 Banden als entweder *Staphylococcus* sp. oder *Planomicrobium* sp. identifiziert. (siehe Tab. 4-5)

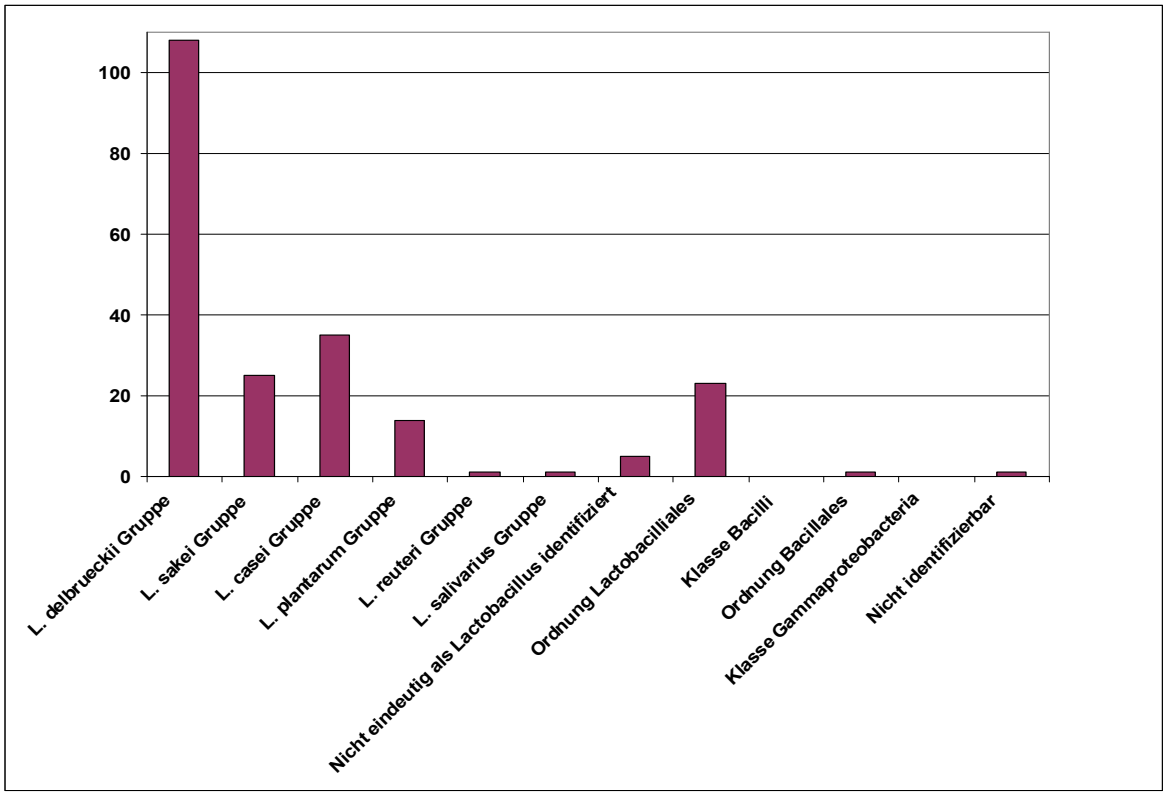

Abb. 4-64: Verteilung der identifizierten Arten der vaginalen Abstriche; Tag 28

Innerhalb der vaginalen Abstriche zum Zeitpunkt 3 dominieren die Vertreter der *L. delbrueckii* Gruppe gefolgt von Vertretern der *L. casei, L. sakei und L. plantarum* Gruppen. Vereinzelt traten Vertreter der *L. salivarus* Gruppe auf. Zum Zeitpunkt 3 gab eindeutige Hinweise auf die Anwesenheit von Vertretern der *L. reuteri* Gruppe und der *L. salivarius* Gruppe.

Es wurden insgesamt 5 Banden nicht eindeutig der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet, 3 dieser Banden gehören entweder der *L. sakei* Gruppe an oder es handelt sich um *Lactococcus spp.* Bei den beiden Anderen handelt es sich entweder um *L. parabuchneri* oder *Leuconostoc spp.*

Insgesamt wurden 23 Vertreter der Ordnung *Lactobacilliales* zugeordnet, wobei zu diesem Zeitpunkt 8 eindeutig als *Leuconostoc spp*., 2 als *Weisella spp*. und 3 als *Carnobactium spp*. identifiziert wurden. Bei den übrigen 10 Arten handelt es sich entweder um *Leuconostoc spp., Lactococcus spp.* oder *Lactobacillus spp.*

Zuletzt wurden 1 Banden als entweder *Staphylococcus* sp. oder *Planomicrobium* sp. identifiziert

4.2.4. Enterokokken PCR

Da relevante Enterokokken, ebenso wie Lactobacillen auf MRS-Agar wachsen, und die teilweise sehr hohen Keimzahlen der semiquantitativen Keimzahlbestimmung nicht mit den Ergebnissen der DGGE korrelieren, wurde der Vollständigkeit halber jede Probe ebenfalls auf Enterokokken untersucht. Die Durchführung dieser PCR erfolgte mit dem Enterokokkenspezifischen Primersystem Espp-1 - Espp-2. (RINTILLÄ, 2004)

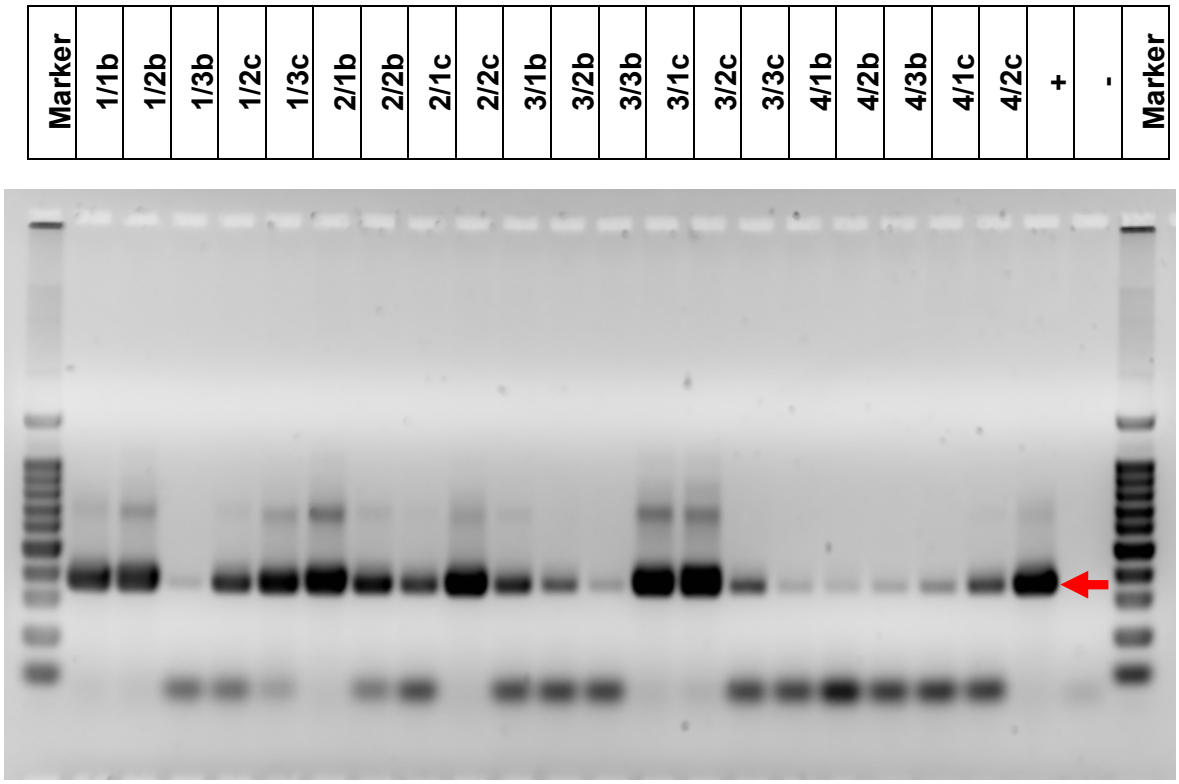

Abb. 4-65: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 1/1b - 4/2c,

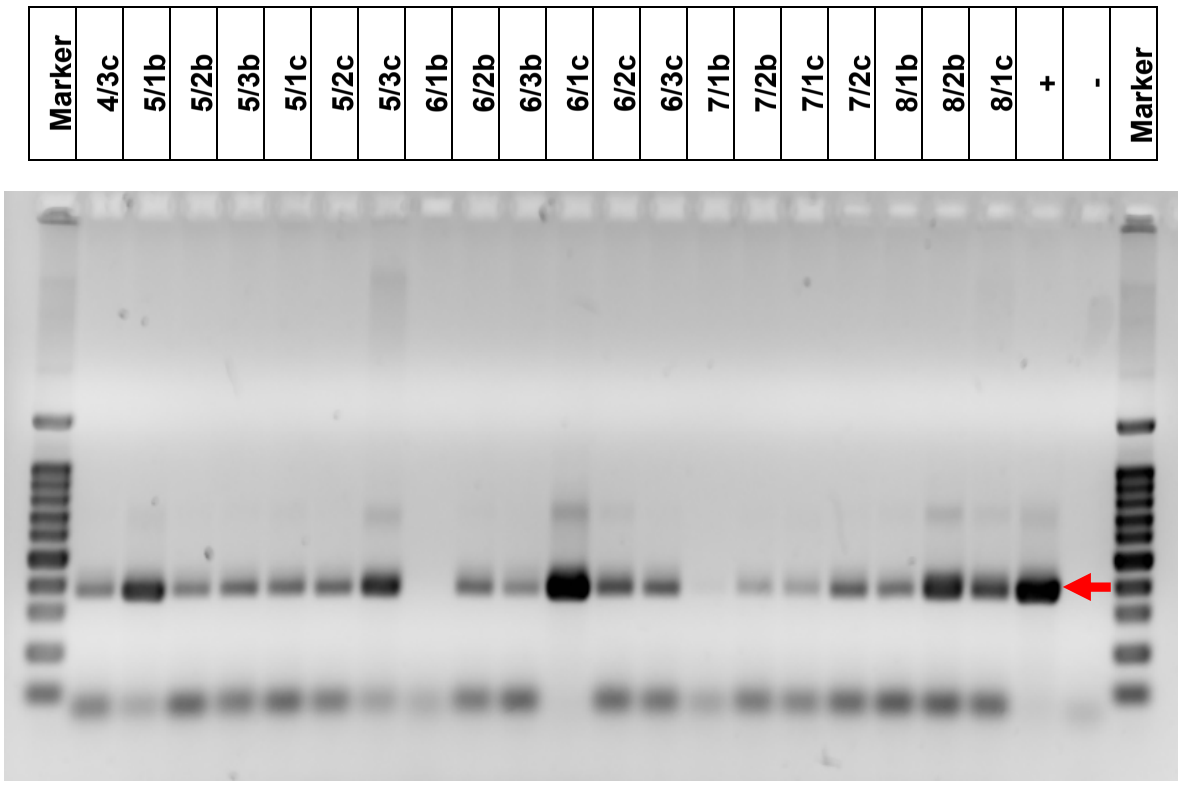

Abb. 4-66: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 4/3c – 8/1c

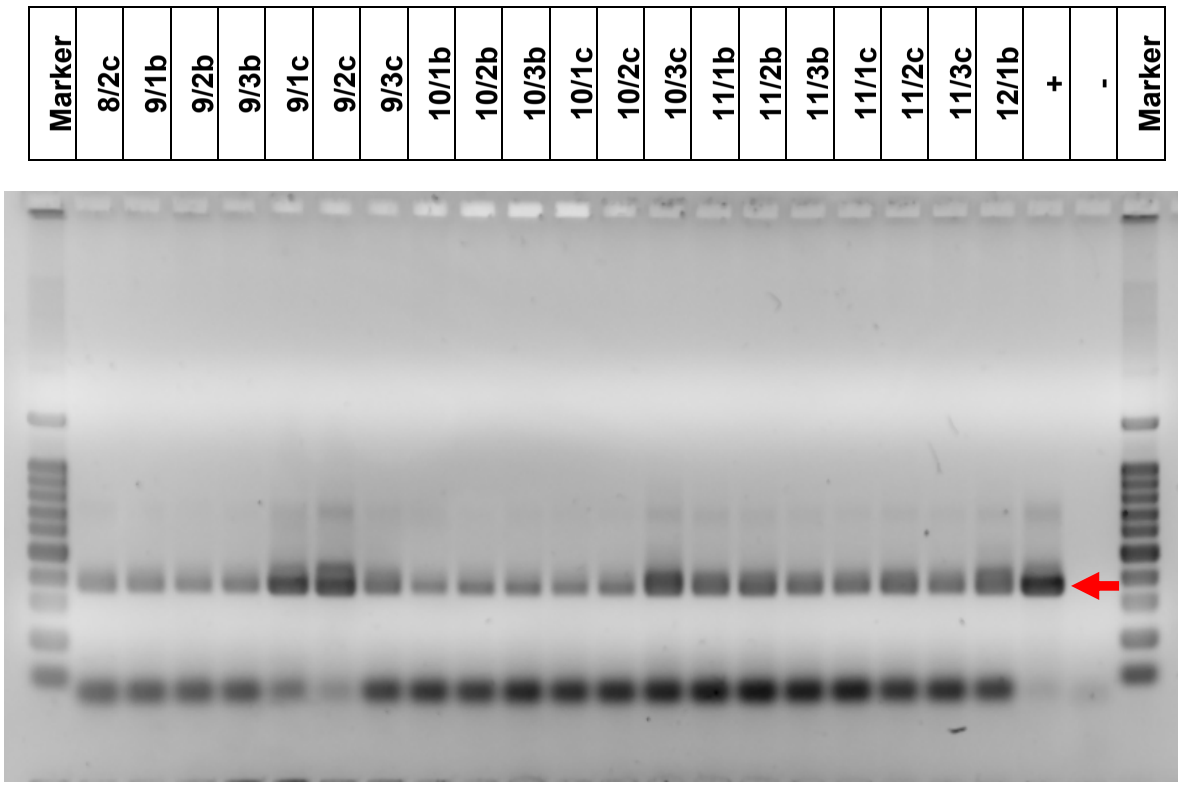

Abb. 4-67: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 8/2c - 12/1b

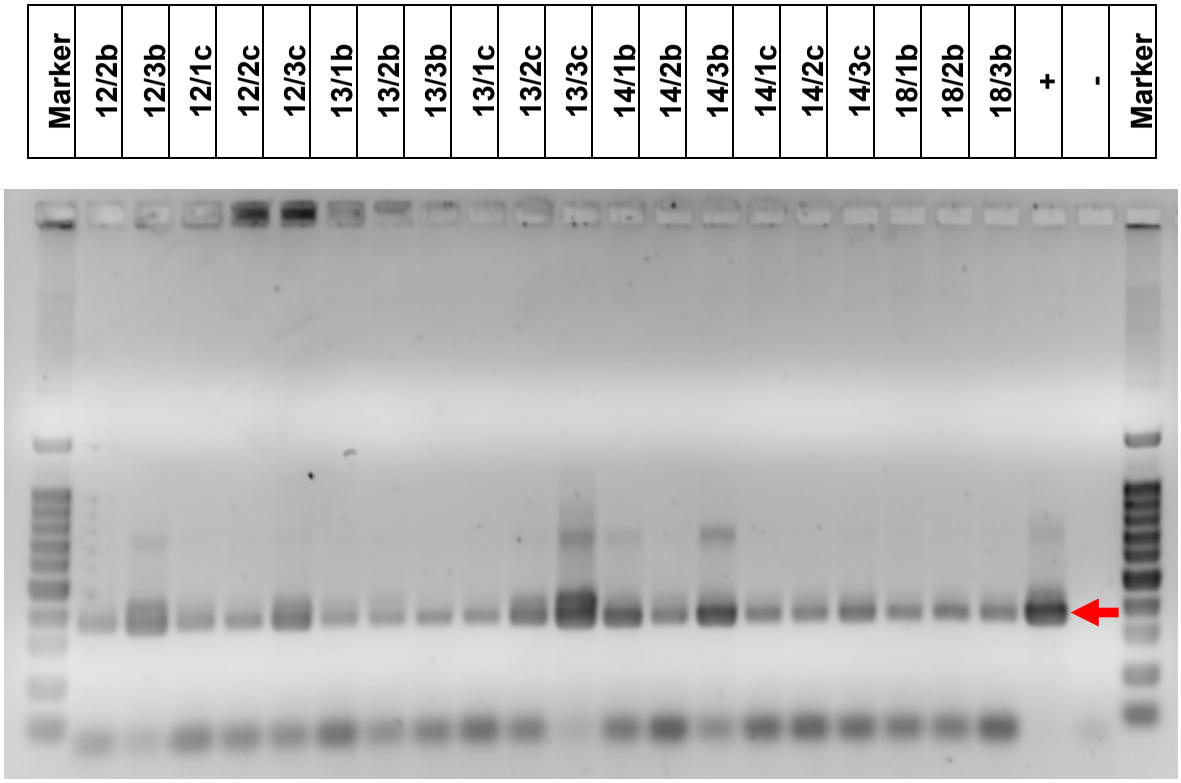

Abb. 4-68: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 12/2b – 18/3b

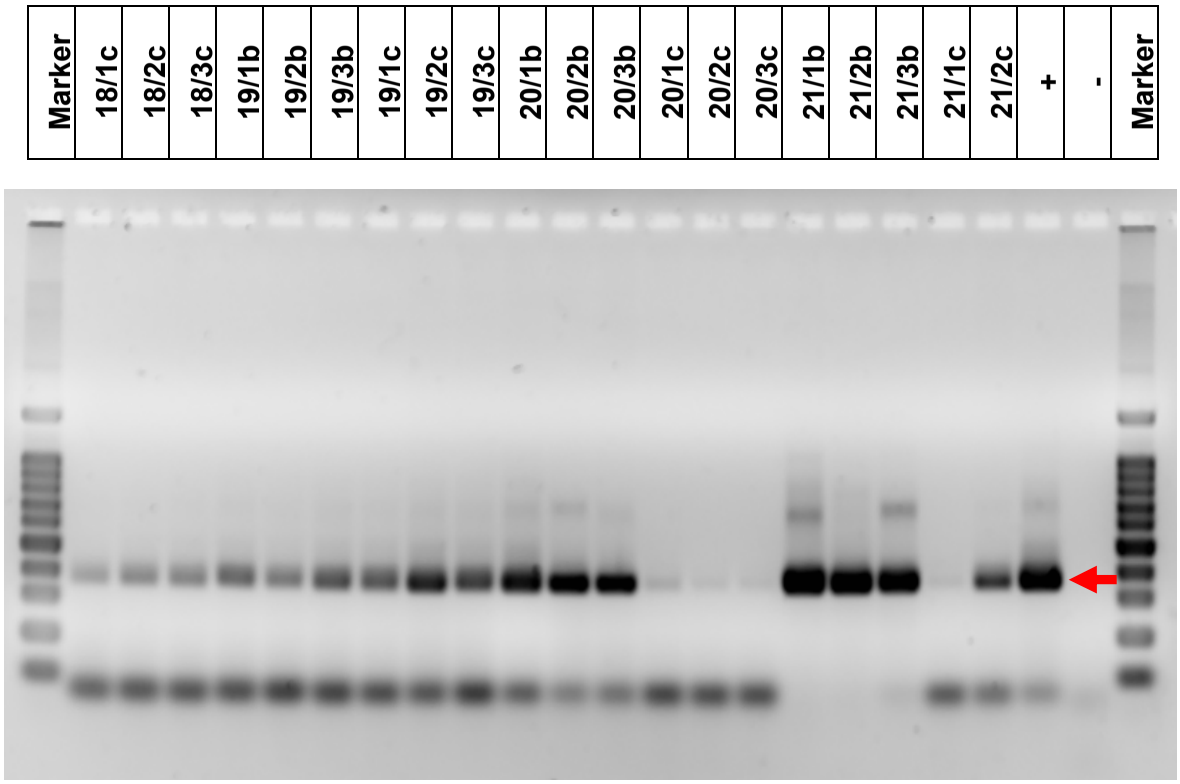

Abb. 4-69: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 18/1c – 21/2c

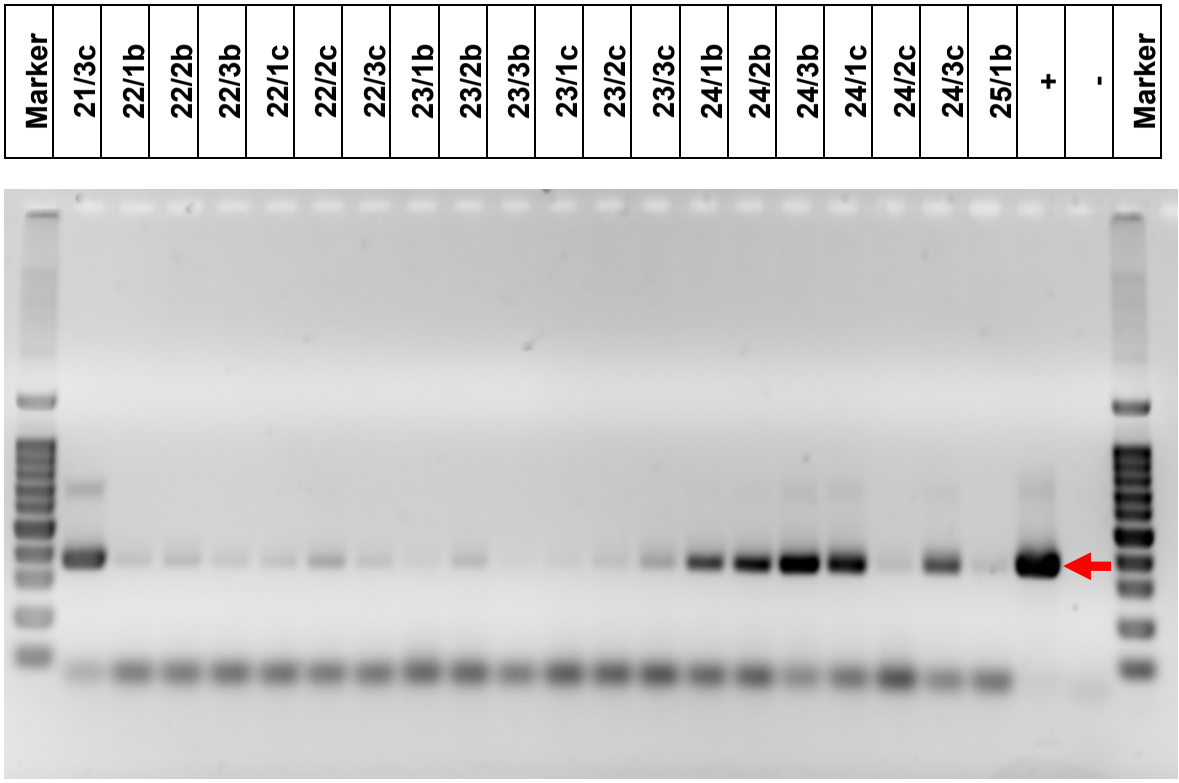

Abb. 4-70: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 21/3c – 25/1b

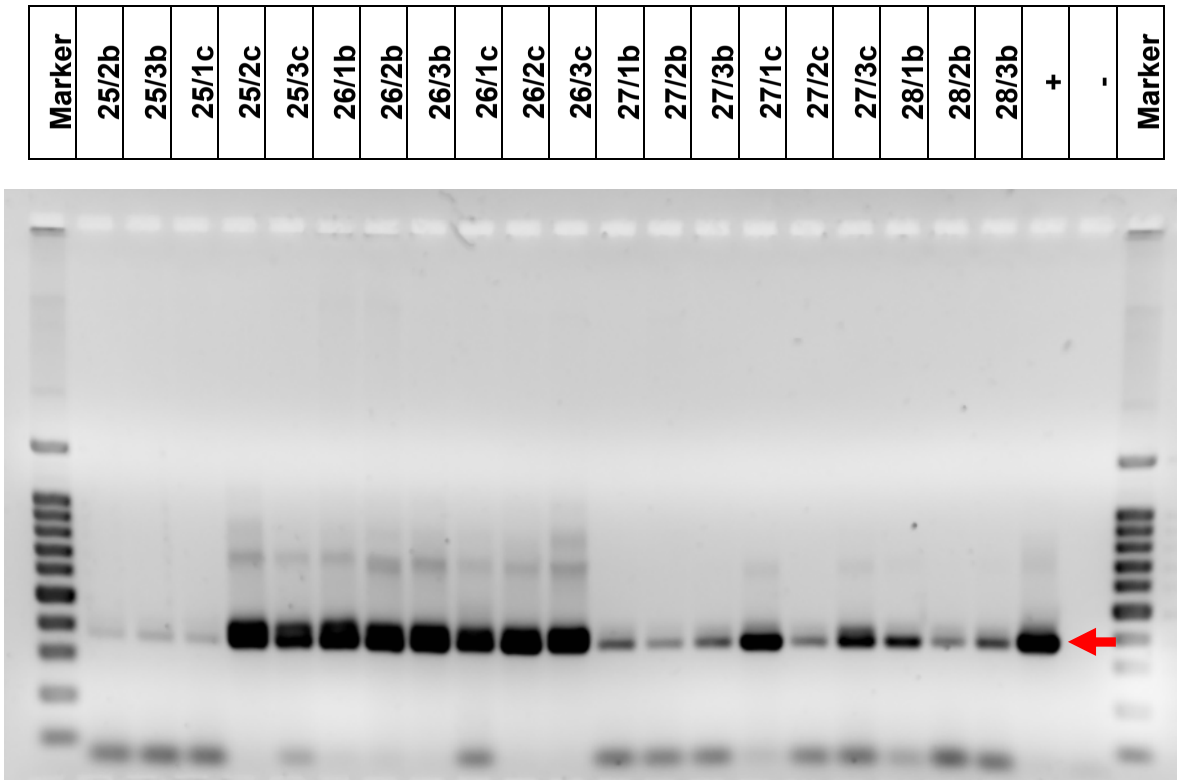

Abb. 4-71: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 25/2b – 28/3b

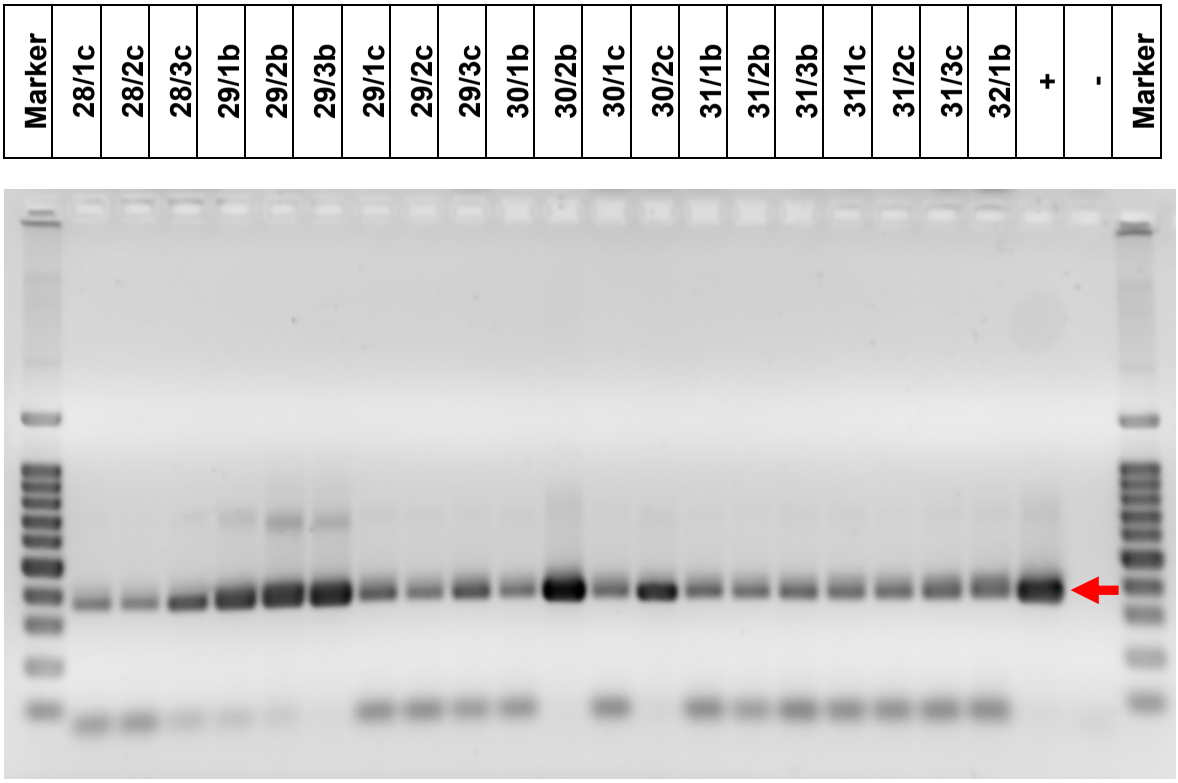

Abb. 4-72: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 28/1c – 32/1b

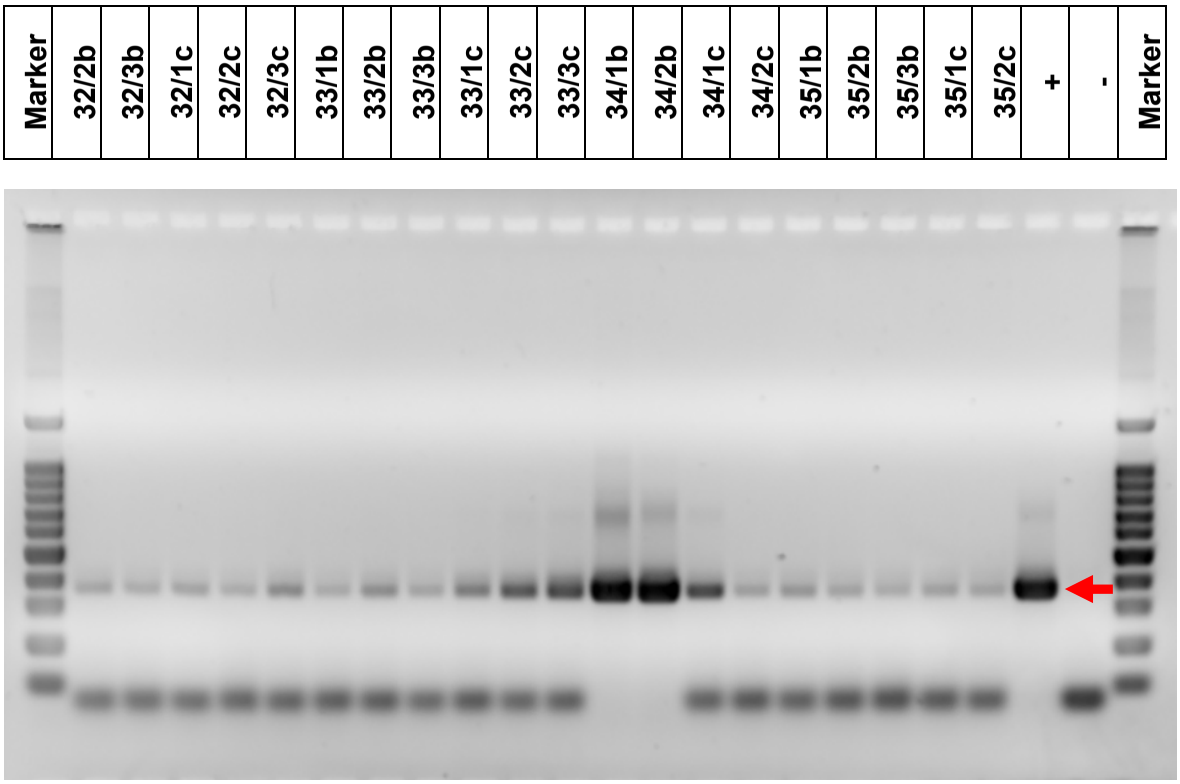

Abb. 4-73: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 32/2b – 35/2c

Marker	35/3c	361b	36/2b	36/3b	36/1c	36/2c	36/3c	37/1b	37/2b	37/3b	37/1c	37/2c	37/3c	38/1b	38/2b	38/3b	38/1c	38/2c	38/3c	39/1b	+	-	Marker

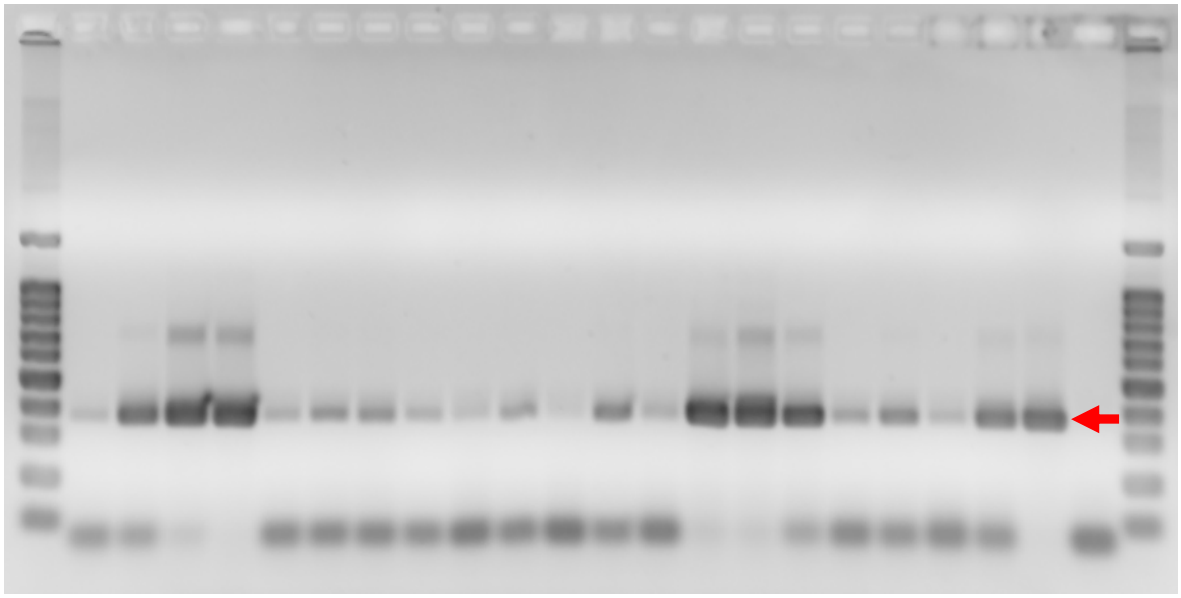

Abb. 4-74: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 35/3c – 39/1b

Marker	39/2b	39/3b	39/1c	39/2c	39/3c	40/1b	40/2b	40/3b	40/1c	40/2c	40/3c	41/1b	41/2b	41/3b	41/1c	41/2c	41/3c	42/1b	42/2b	42/3b	+	-	Marker

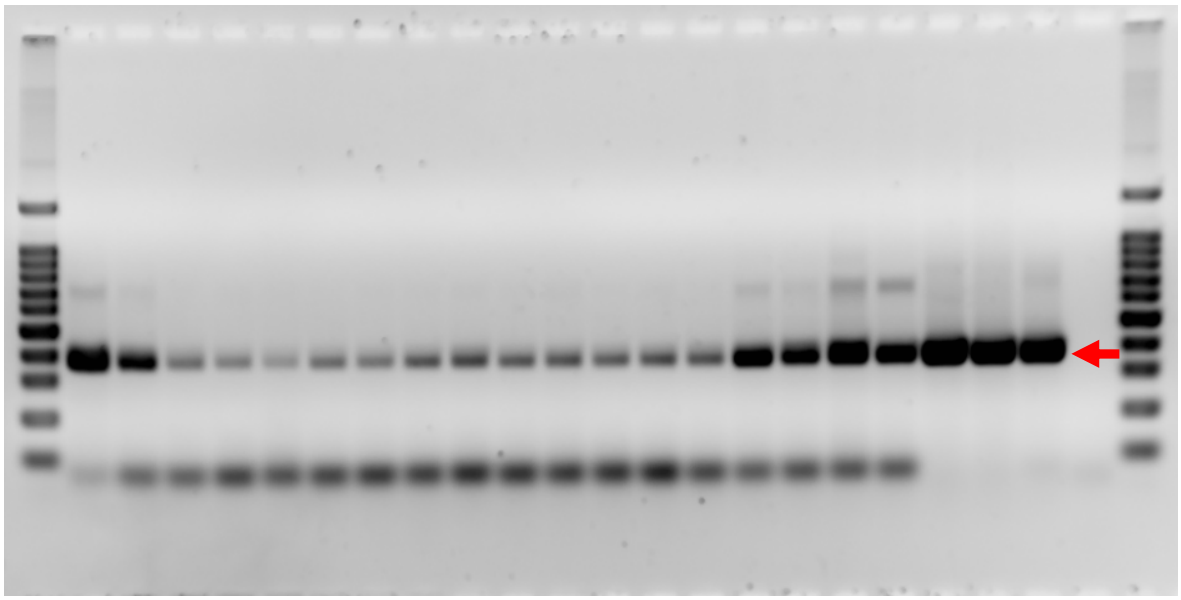

Abb. 4-75: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 39/2b –42/3b

Marker	42/1c	42/2c	42/3c	43/1b	43/2b	43/3b	43/1c	43/2c	43/3c	44/1b	44/2b	44/3b	44/1c	44/2c	44/3c	46/1b	46/2b	46/3b	46/1c	46/2c	+	-	Marker

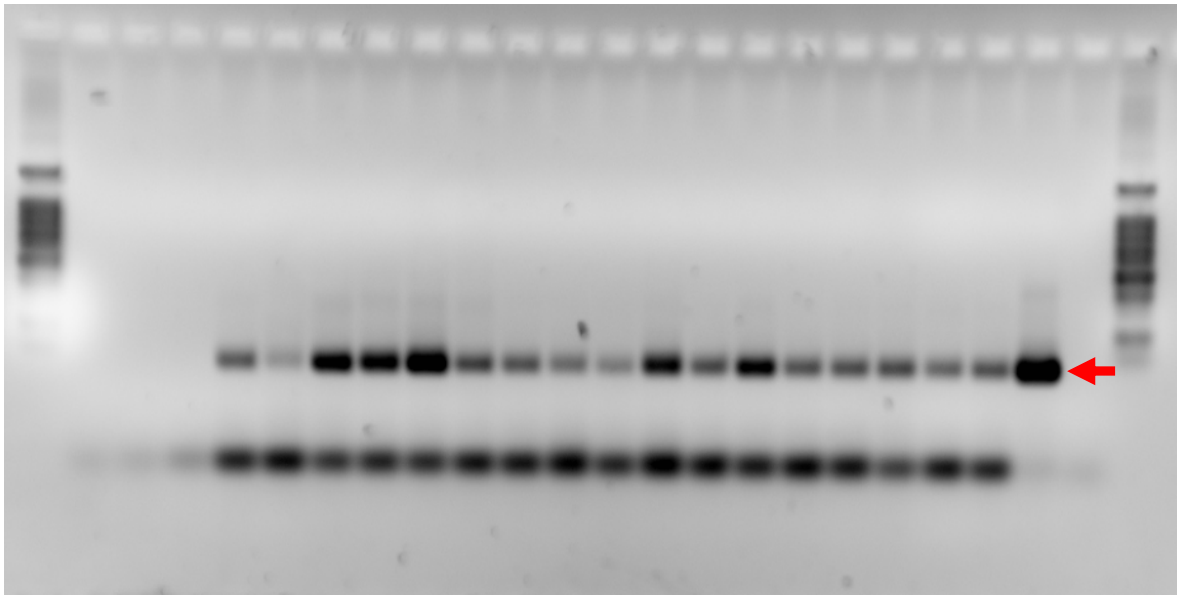

Abb. 4-76: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 42/1c –46/2c

Marker	46/3c	47/1b	47/2b	47/3b	47/1c	47/2c	47/3c	50/1b	50/2b	50/3b	50/1c	50/2c	50/3c	+	-	Marker					

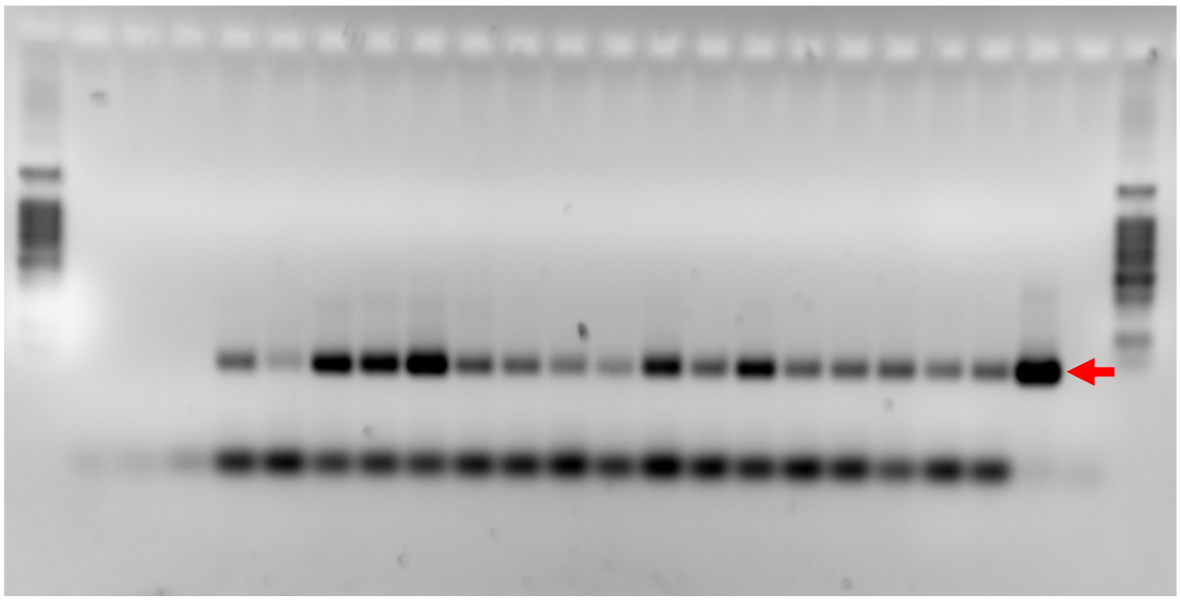

Abb. 4-77: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 42/1c –46/2c

5. Diskussion

Neben der molekularen Detektion und Identifizierung der Lactobacillen in den beiden untersuchten humanen Habitaten lag das Ziel dieser Arbeit in der Analyse der Auswirkungen des oral verabreichten Probiotikums auf die rektale und vaginale Mikrobiota der Probandinnen. Aufgrund des altersbedingten Sinken des Östrogenspiegels vermindert sich sowohl die Quantität als auch die Diversität der Lactobacillen in der Vagina. Die Folge kann eine erhöhte Exposition für Geschlechtskrankheiten, Pilzinfektionen oder Bakterielle Vaginose sein. Die Entwicklung von Probiotika die, die vaginale Mikrobiota stabilisieren bzw. optimieren, ist von größter Bedeutung für die Gesundheit der der vaginalen Mikrobiota und somit für die Gesundheit der Frau. (JANITSCHEK, 2010; PETRICEVIC et al., 2008)

5.1. Ergebnisse der Keimzahlbestimmung

Da die Kultivierung der Mikroorganismen der Proben auf MRS-Agar stattgefunden hat, handelt es sich bei den kultivierten Arten nicht zwingend um Vertreter der Gattung *Lactobacillus*. MRS-Agar ist nicht selektiv für Lactobacillen, sondern fördert das Wachstum vieler Milchsäurebakterien. Zu diesen zählen die Gattungen *Streptococcus*, *Pediococcus, Enterococcus* und *Leuconostoc,* die das Ergebnis der semiquantitativen Keimzahlbestimmung beeinflussen bzw. verfälschen können. Die semiquantitative Keimzahlbestimmung ist deshalb als Milchsäurebakterien-Keimzahl zu verstehen. Aus diesem Grund wurde jede Probe mittels Enterokokken-spezifischer PCR, nach Rinttilä, 2004 auf diese untersucht. (JANITSCHEK, 2010; OXOID, 2003; SCHILLINGER und HOLZAPFEL, 2003)

5.2. Ergebnisse der PCR-DGGE

Da die Proben direkt isoliert und mittels einer kultivierungs-unabhängigen Methode, der PCR-DGGE nach Walter et al. 2001 untersucht wurden, schließt die Analyse sowohl lebende als auch tote Mikroorganismen mit ein, sofern die Autolysemechanismen noch nicht zu stark eingesetzt haben. Die Lactobacillen-spezifischen, doppelsträngigen Amplicons der V2-V3 Region der 16S rRNA wurden aufgrund ihrer spezifischen Denaturierungs (melting) Profile mittels der DGGE getrennt. (LEE et. al, 2010; ERCOLINI, 2004)

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Studien von Krondorfer, 2008 und Janitschek, 2010 wurde bei dieser Studie die Sensitivität der PCR-DGGE erhöht. Die Zykluszahl der PCR wurde um fünf Zyklen erhöht, was bei der Annahme einer PCR-Effektivität von 80% zu einer Senisitivitäts-steigerung von rund 30% führt. Repräsentative Banden wurden sequenziert und mittels der Software Bionumerics Version 6.5 ausgewertet.
Die folgenden Tabellen 5-1, 5-2, 5-3 und Abbildungen 5-1, 5-2, 5-3 geben einen Überblick über die durch PCR-DGGE erhaltenen und identifizierten Arten.

Tab. 5-1: Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten

Zeitpunkt 1	Vaginal	Rektal	Gesamt
L.delbrueckii Gruppe	97	91	188
L. sakei Gruppe	29	19	48
L. casei Gruppe	33	34	67
L. plantarum Gruppe	12	17	29
L. reuteri Gruppe	0	0	0
L. salivarius Gruppe	0	1	1
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	9	12	21
Ordnung *Lactobacilliales*	31	32	63
Klasse *Bacilli*	3	2	5
Ordnung *Bacillales*	6	1	7
Klasse *Gammaproteobacteria*	1	0	1
Nicht identifizierbar	1	0	1

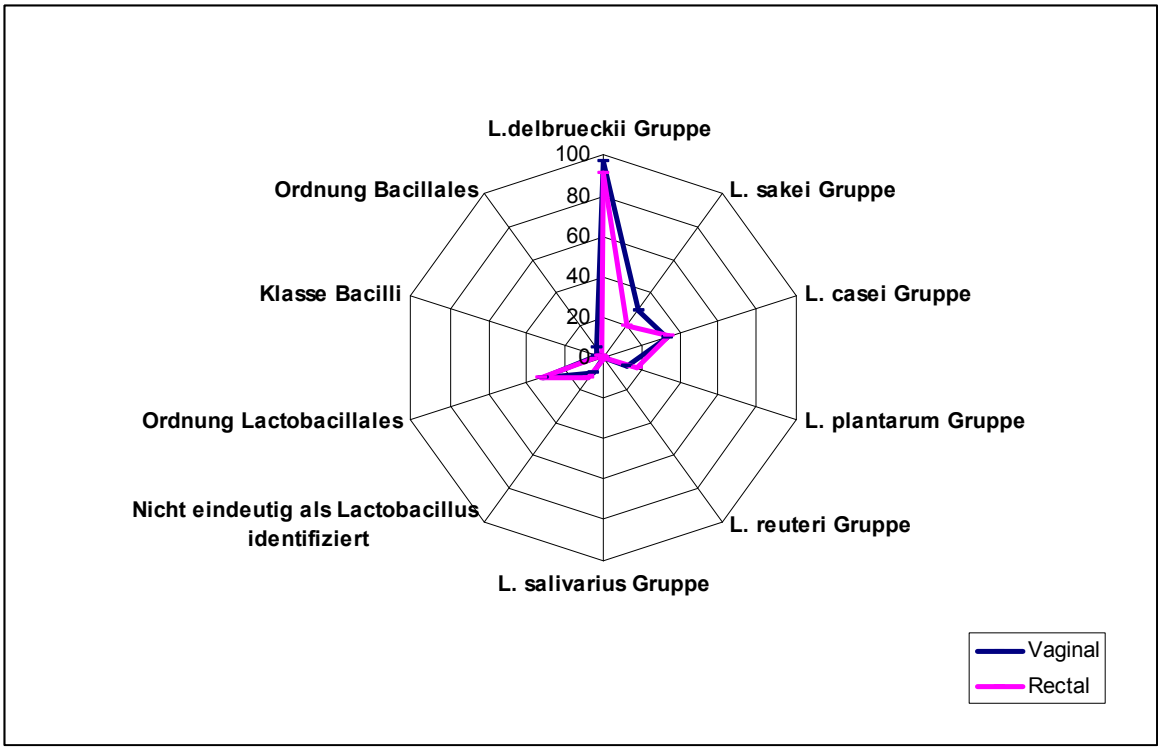

Abb. 5-1: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen und vaginalen Proben zum Zeitpunkt 1 unter Vernachlässigung von Gammaproteobacterien und nicht identifzierten Arten aus Tab. 5-1

Tab. 5-2: Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten

Zeitpunkt 2	Vaginal	Rektal	Gesamt
L.delbrueckii Gruppe	102	108	210
L. sakei Gruppe	30	21	51
L. casei Gruppe	37	30	67
L. plantarum Gruppe	17	14	31
L. reuteri Gruppe	1	0	1
L. salivarius Gruppe	1	3	4
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	8	16	24
Ordnung *Lactobacilliales*	33	26	59
Klasse *Bacilli*	0	2	2
Ordnung *Bacillales*	2	3	5
Klasse *Gammaproteobacteria*	0	0	0
Nicht identifizierbar	1	0	1

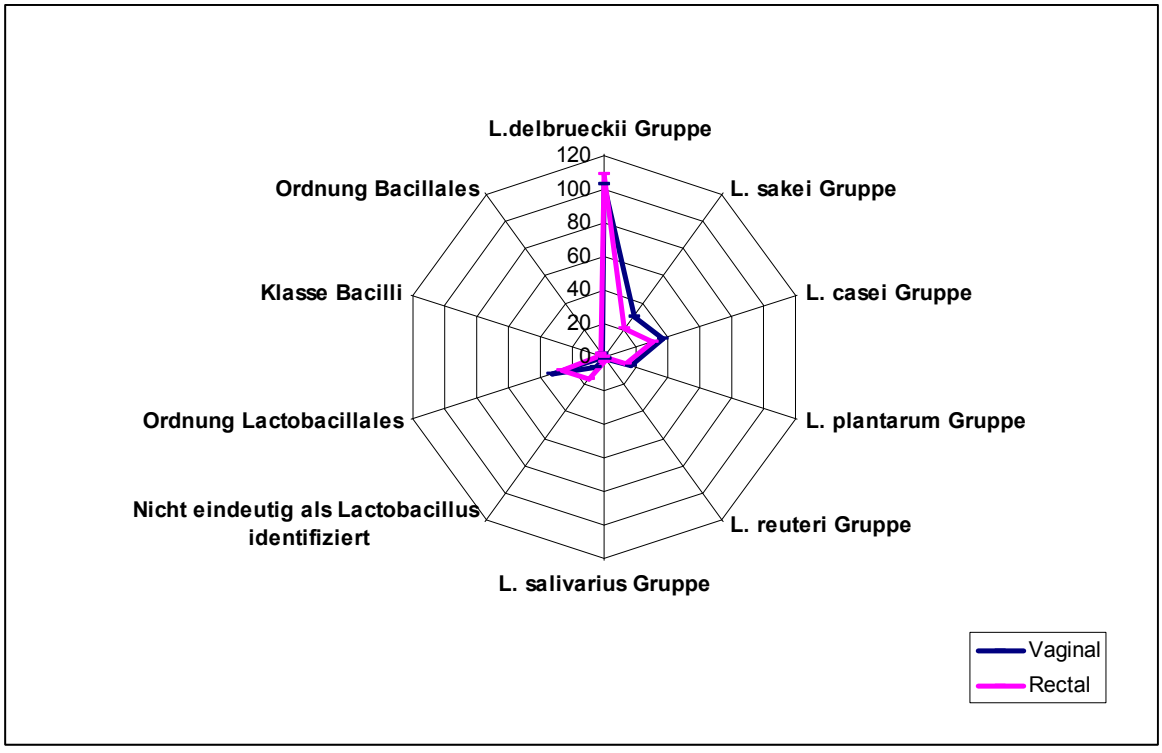

Abb. 5-2: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen und vaginalen Proben zum Zeitpunkt 2 unter Vernachlässigung von Gammaproteobacterien und nicht identifzierten Arten aus Tab. 5-2

Tab. 5-3 Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten

Zeitpunkt 3	Vaginal	Rektal	Gesamt
L.delbrueckii Gruppe	108	90	198
L. sakei Gruppe	25	23	48
L. casei Gruppe	35	33	68
L. plantarum Gruppe	14	16	30
L. reuteri Gruppe	1	0	1
L. salivarius Gruppe	1	1	2
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	5	11	16
Ordnung *Lactobacilliales*	23	27	50
Klasse *Bacilli*	0	1	1
Ordnung *Bacillales*	1	1	2
Klasse *Gammaproteobacteria*	0	0	0
Nicht identifizierbar	1	0	1

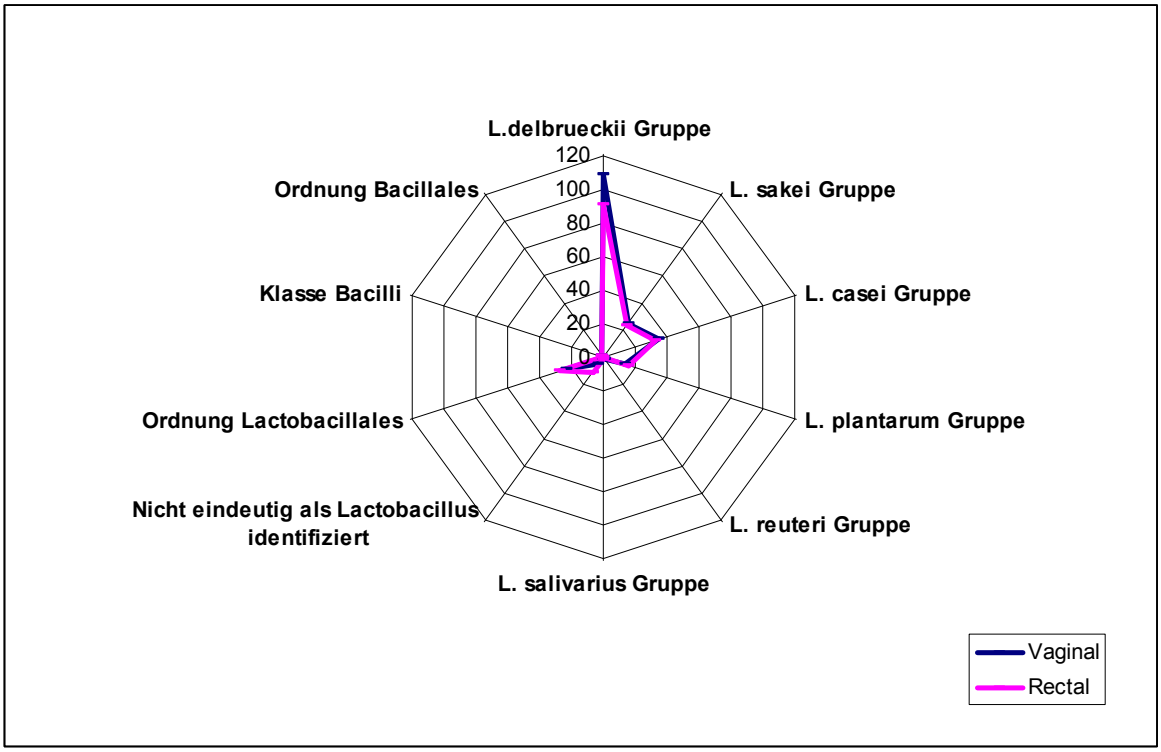

Abb. 5-3: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen und vaginalen Proben zum Zeitpunkt 3 unter Vernachlässigung von Gammaproteobacterien und nicht identifzierten Arten aus Tab. 5-3

Die Ergebnisse zeigen das Vertreter der *L. delbrueckii* Gruppe während aller Zeitpunkte sowohl rektal aus auch vaginal dominieren. Danach folgen Vertreter der *L. casei* Gruppe, der *L. sakei* Gruppe und der *L. plantarum* Gruppe. Vertreter der Ordnung *Lactobacilliales,* wobei hauptsächlich *Leuconostoc spp*. dominieren sind ebenfalls nachweisbar. Vereinzelt konnten auch Vertreter der *L. reuteri* Gruppe und der *L. salivarius* Gruppen nachgewiesen werden, ebenso wie Staphylococcen spp., *Carnobacterium* spp. und *Weisella* spp.

Die grafischen Darstellungen zeigen das sich Stabilität und Quantität der identifizierten Arten über den Zeitraum von 28 Tagen in der Gesamtanalyse so gut wie nicht verändert haben.

Tab. 5-4: Vergleich der identifizierten Lactobacillen Arten der rektalen Abstriche (bezogen auf alle Probandinnen)

Rektal	Tag 0	Tag 14	Tag 28
L. delbrueckii Gruppe	91	108	90
L. sakei Gruppe	19	21	23
L. casei Gruppe	34	30	33
L. plantarum Gruppe	17	14	16
L. reuteri Gruppe	0	0	0
L. salivarius Gruppe	1	3	1
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	12	16	11
Ordnung Lactobacilliales	32	26	27
Klasse *Bacilli*	2	2	1
Ordnung *Bacillales*	1	3	1
Klasse Gammaproteobacteria	0	0	0
Nicht identifizierbar	0	0	0

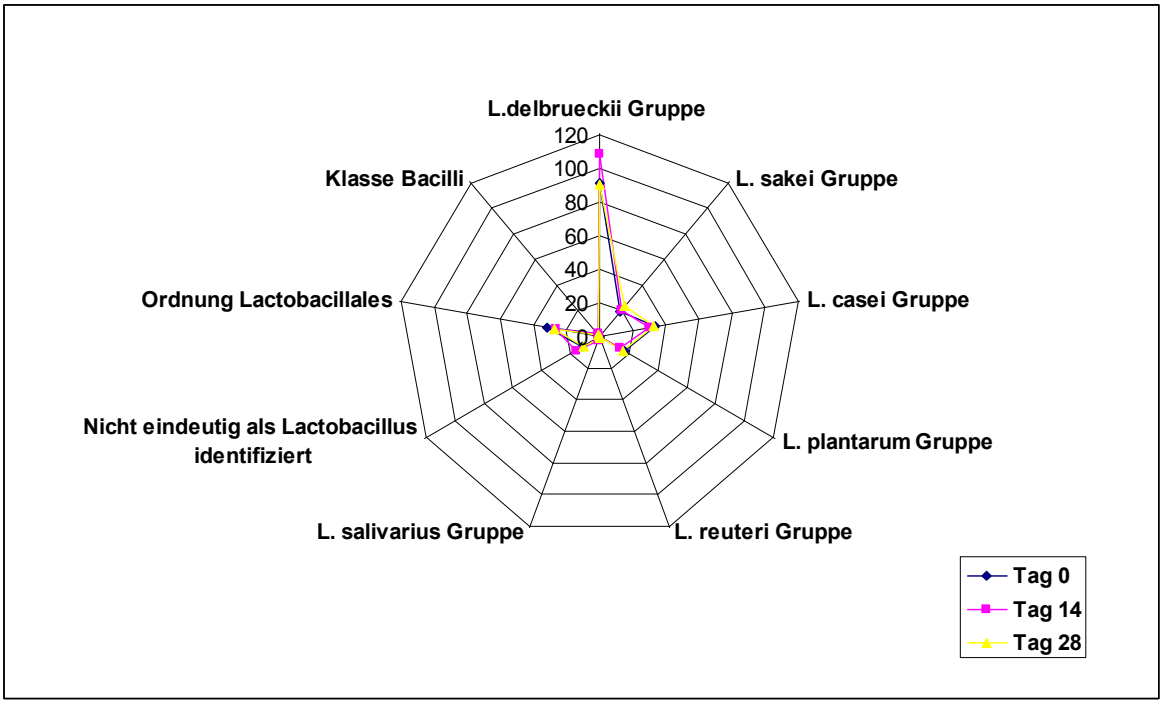

Abb. 5-4: Grafischer Darstellung der in Tab.5-12 dargestellten Ergebnisse der rektalen Abstriche

Tab. 5-5: Vergleich der identifizierten Lactobacillen Arten der vaginalen Abstriche (bezogen auf alle Probandinnen)

Vaginal	Tag 0	Tag 14	Tag 28
L. delbrueckii Gruppe	97	102	108
L. sakei Gruppe	29	30	25
L. casei Gruppe	33	37	35
L. plantarum Gruppe	12	17	14
L. reuteri Gruppe	0	1	1
L. salivarius Gruppe	0	1	1
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	9	8	5
Ordnung *Lactobacilliales*	31	33	23
Klasse *Bacilli*	3	0	0
Ordnung *Bacillales*	6	2	1
Klasse Gammaproteobacteria	1	0	0
Nicht identifizierbar	1	1	1

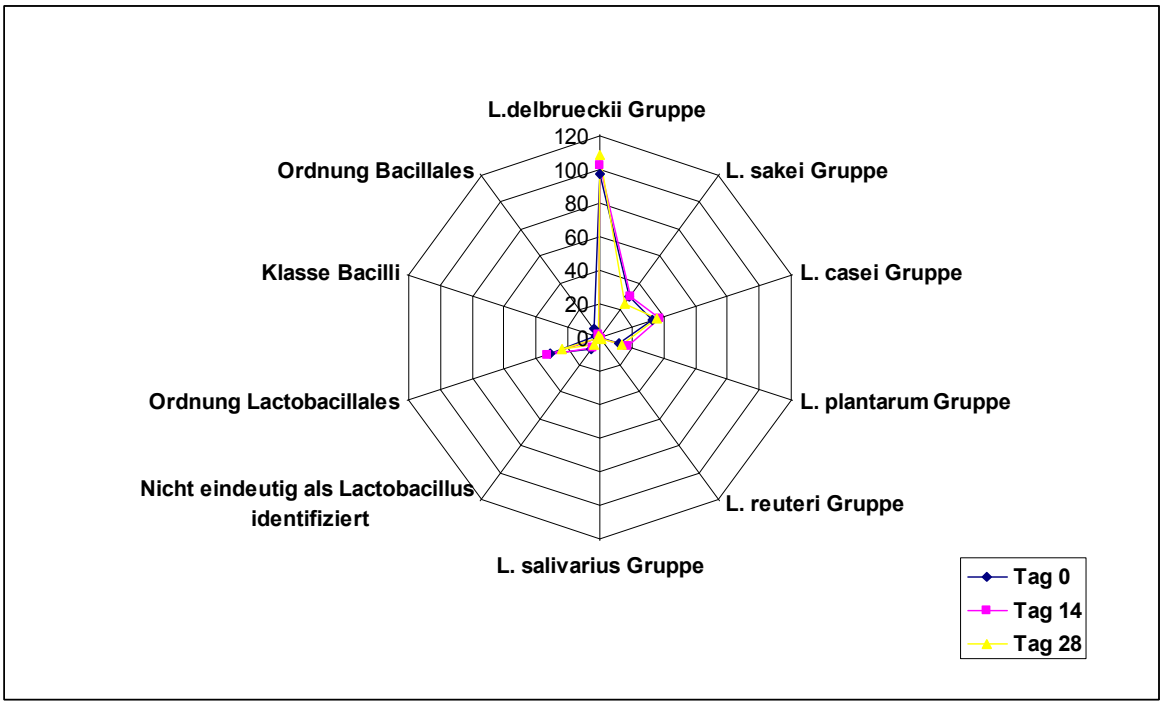

Abb. 5-5: Grafischer Darstellung der in Tab.5-13 dargestellten Ergebnisse der vaginalen Abstriche

Tab. 5-6: Vergleich der Gesamtzahl (rektal und vaginal) für die Zeitpunkte 1-3

	Identifizierte Arten	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3
L. delbrueckii group	*L. crispatus*	33	34	31
	L. delbrueckii group 1	31	35	29
	L. delbrueckii group 2	0	0	4
	L. delbrueckii	46	48	37
	L. gasseri	46	55	56
	L. iners	2	1	4
	L. jensenii	26	34	33
	L. johnsonii	4	3	4
L. sakei group	*L. sakei group*	43	44	40
	L. sakei	5	7	8
L. casei group	*L. rhamnosus*	6	6	4
	L. paracasei	1	2	1
	L. rhamnosus/L. paracasei	49	49	53
	L. casei group	11	10	10
L. plantarum group	*L. plantarum*	29	31	30
L. reuteri group	*L. mucosae*	0	0	1
	L. vaginalis	0	1	0
L. salivarius group	*L. ruminis*	1	1	0
	L. salivarius	0	3	2
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	*L. sakei group oder Lactococcus sp.*	19	18	12
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	*L. parabuchneri oder Leuconostoc spp.*	4	6	4
Genus *Lactobacilliales*	*Weissella spp.*	2	1	2
	Leuconostoc spp. oder Lactococcus spp. oder Lactobacillus spp.	23	21	16
	Leuconostoc lactis	4	3	3
	Leuconostoc citreum	16	22	17
	Leuconostoc spp.	5	2	3
	Carnobacterium spp.	13	10	9
Class *Bacilli*	*Staphylococcus spp.*	5	2	1
Nicht eindeutig identifiziert	*Staphylococcus spp. oder Planomicrobium spp.*	7	5	2
Class Gammaproteobacteria	*Morganella morganii*	1	0	0
Nicht identifizierbar	Not identified by sequencing	1	1	1

Innerhalb der eindeutig identifizierten Lactobacillus Arten sind für alle 3 Zeitpunkte in der Gesamtauswertung (rektal und vaginal) *L. gasseri* und *L.delbrueckii* die am häufigsten vertretenen Arten, gefolgt von *L. crispatus, L. plantarum* und *L. jensenii.* Desweiteren konnten in geringer Zahl *L. rhamnosus*, *L. sakei, L. johnsonii, L. iners* und *L. paracasei* nachgewiesen werden. Vereinzelt traten auch *L. ruminis*, L. *mucosae* und *L. vaginalis* auf. Die Verteilung der Verhältnisse der einzelnen Arten zueinander ist stabil und die Schwankungen innerhalb von 28 Tagen so gering das sie vernachlässigbar sind.

Wie bereits erwähnt sind die mit *L. rhamnosus / L. paracasei* identifizierten Banden insgesamt ähnlich stark vertreten wie *L. gasseri*. Da es jedoch unmöglich ist die Verteilung auf *L. rhamnosus* und *L. paracasei* abzuschätzen wird ihre Dominanz nur in der Auswertung der phylogenetischen Gruppen nach Felis und Dellaglio, 2007, sichtbar. (Abb. 5-1, Abb. 5-2, Abb. 5-3 und Tab. 5-1, 5-2, 5-3)

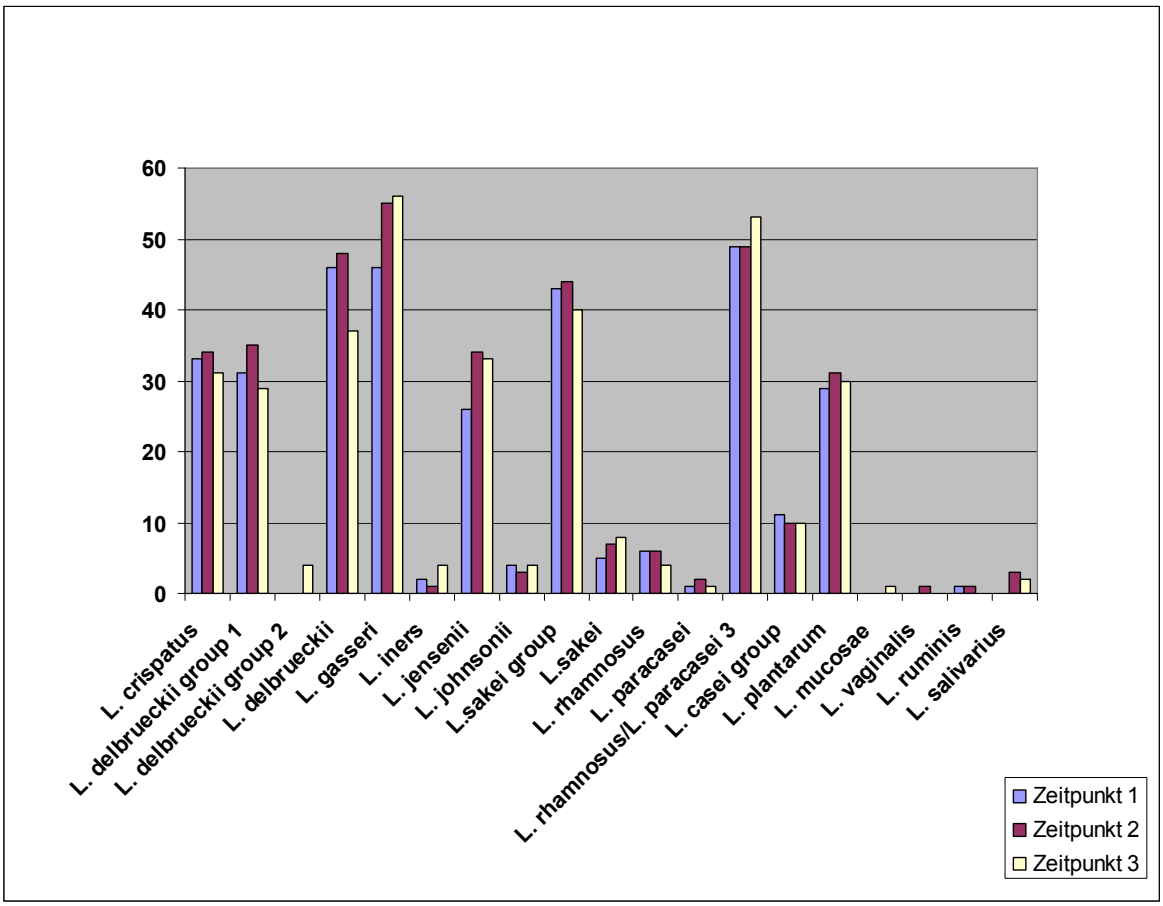

Abb. 5-6: Grafische Darstellung der in Tab. 5-4 dargestellten Gesamtzahlen der eindeutig identifizierten Lactobacillen

5.2.1. Auswertung mittels Bionumerics – Rektal: Tag 0 und Tag 14

Tab. 5-7: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 0 und Tag 14

Rektal	Übereinstimmung Tag 0 und 14 (in Zahlen)	Übereinstimmung Tag 0 und 14 (in %)	Proben
0%	0	0,0	
>5%	0	0,0	
>10%	1	2,5	30
>15%	0	0,0	
>20%	0	0,0	
>25%	2	5,0	7,25
>30%	2	5,0	2,27
>35%	1	2,5	6
>40%	0	0,0	
>45%	1	2,5	28
>50%	3	7,5	22,23,50
>55%	3	7,5	3,19,43
>60%	4	10,0	4,9,24,26
>65%	4	10,0	13,29,33,34
>70%	0	0,0	
>75%	1	2,5	39
>80%	4	10,0	8,35,41,47
>85%	2	5,0	18,32
>90%	6	15,0	11,12,14,31,44,46
>95%	0	0,0	
100%	6	15,0	5,10,20,36,38,40

5.2.2. Auswertung mittels Bionumerics – Rektal: Tag 0 und Tag 28

Tab. 5-8: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 0 und Tag 28

Rektal	Übereinstimmung Tag 0 und 28 (in Zahlen)	Übereinstimmung Tag 0 und 28 (in %)	Proben
0%	1	2,9	20
>5%	0	0,0	
>10%	0	0,0	
>15%	0	0,0	
>20%	1	2,9	13
>25%	1	2,9	25
>30%	0	0,0	
>35%	2	5,7	28,46
>40%	0	0,0	
>45%	1	2,9	26
>50%	2	5,7	4,6
>55%	3	8,6	9,23,50
>60%	4	11,4	27,29,33,39
>65%	3	8,6	12,24,41
>70%	7	20,0	5,10,11,19,36,40,44
>75%	1	2,9	38
>80%	2	5,7	14,43
>85%	3	8,6	18,32,47
>90%	3	8,6	22,31,35
>95%	0	0,0	
100%	1	2,9	3

5.2.3. Auswertung mittels Bionumerics – Rektal: Tag 14 und Tag 28

Tab. 5-9: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 14 und Tag 28

Rektal	Übereinstimmung Tag 14 und 28 (in Zahlen)	Übereinstimmung Tag 14 und 28 (in %)	Proben
0%	1	2,7	20
>5%	0	0,0	
>10%	0	0,0	
>15%	0	0,0	
>20%	0	0,0	
>25%	2	5,4	3,23
>30%	2	5,4	21,27
>35%	2	5,4	28,46
>40%	0	0,0	
>45%	3	8,1	13,22,26
>50%	1	2,7	43
>55%	0	0,0	
>60%	4	10,8	9,29,33,41
>65%	2	5,4	4,44
>70%	6	16,2	5,10,12,32,36,40
>75%	5	13,5	11,25,35,38,50
>80%	5	13,5	6,19,24,39,47
>85%	0	0,0	
>90%	1	2,7	14
>95%	1	2,7	31
100%	2	5,4	18,37

5.2.4. Auswertung mittels Bionumerics – Vaginal: Tag 0 und Tag 14

Tab. 5-10: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 0 und Tag 14

Vaginal	Übereinstimmung Tag 0 und 14 (in Zahlen)	Übereinstimmung Tag 0 und 14 (in %)	Proben
0%	0	0,0	
>5%	0	0,0	
>10%	0	0,0	
>15%	0	0,0	
>20%	1	2,3	6
>25%	0	0,0	
>30%	1	2,3	2
>35%	1	2,3	5
>40%	2	4,5	7,20
>45%	2	4,5	21,30
>50%	2	4,5	3,34
>55%	0	0,0	
>60%	1	2,3	12
>65%	2	4,5	42,44
>70%	3	6,8	1,26,39
>75%	4	9,1	13,32,37,47
>80%	7	15,9	4,8,9,14,23,25,28
>85%	7	15,9	11,19,22,38,41,46,50
>90%	7	15,9	10,18,27,31,35,40,43
>95%	0	0,0	
100%	4	9,1	24,29,33,36

5.2.5. Auswertung mittels Bionumerics – Vaginal: Tag 0 und Tag 28

Tab. 5-11: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 0 und Tag 14

Vaginal	Übereinstimmung Tag 0 und 28 (in Zahlen)	Übereinstimmung Tag 0 und 28 (in %)	Proben
0%	0	0,0	
>5%	0	0,0	
>10%	0	0,0	
>15%	0	0,0	
>20%	1	2,6	6
>25%	1	2,6	1
>30%	1	2,6	32
>35%	2	5,1	5,20
>40%	0	0,0	
>45%	0	0,0	
>50%	2	5,1	3,26
>55%	2	5,1	12,24
>60%	1	2,6	29
>65%	6	15,4	25,28,39,42,44,50
>70%	1	2,6	38
>75%	2	5,1	21,41
>80%	3	7,7	11,14,43
>85%	4	10,3	19,23,27,46
>90%	9	23,1	4,9,10,19,22,31,35,37,40
>95%	0	0,0	
100%	4	10,3	13,18,33,47

5.2.6. Auswertung mittels Bionumerics – Vaginal: Tag 14 und Tag 28

Tab. 5-12: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 14 und Tag 28

Vaginal	Übereinstimmung Tag 14 und 28 (in Zahlen)	Übereinstimmung Tag 14 und 28 (in %)	Proben
0%	0	0,0	
>5%	0	0,0	
>10%	0	0,0	
>15%	0	0,0	
>20%	0	0,0	
>25%	0	0,0	
>30%	0	0,0	
>35%	1	2,6	1
>40%	0	0,0	
>45%	0	0,0	
>50%	0	0,0	
>55%	2	5,1	21,24
>60%	3	7,7	12,29,39
>65%	1	2,6	44
>70%	3	7,7	25,28,43
>75%	4	10,3	9,13,41,47
>80%	6	15,4	3,11,26,27,37,50
>85%	5	12,8	4,14,19,40,46
>90%	6	15,4	5,6,18,22,23,38
>95%	0	0,0	
100%	8	20,5	10,20,31,32,33,35,36,42

5.3. Interpretation

Da es sich bei den, im Zuge der semiquantitatven Keimzahlbestimmung, kultivierten Arten nicht unbedingt um Vertreter der Gattung *Lactobacillus* handelt, ist eine exakte Interpretation der Quantität der Lactobacillen Mikrobiota nicht möglich. Die Keimzahlen bestätigen jedoch die Dynamik bezüglich der Anzahl der auf MRS-Medium wachsenden Milchsäurebakterien im Verlauf von 28 Tagen, die sowohl durch endogene als auch exogene Faktoren, auch sehr kurzfristig beeinflusst werden kann. (DONATI et al. 2011, FREDRICKS, 2011; GENC und ONDERDONK, 2011). Die Keimzahlen liegen im Bereich der von Janitschek, 2010 postulierten Keimzahlenniveaus von menopausalen Probandinnen und bestätigen in Verbindung mit den PCR-DGGE Analysen, das die Quantität von Lactobacillen, mit zunehmenden Alter sinkt. Die Anwesenheit einer erhöhten Anzahl von Vertretern der Gattung *Enterococcus,* in über 96% aller analysierten Abstriche, die im Zuge dieser Arbeit nachgewiesen wurde, deutet auf eine Veränderung des Habitats hin, die das Wachstum dieser Vertreter der Milchsäurebakterien fördern.

Im Gegensatz zur Studie von Janitschek, 2010, zeigt diese Arbeit das die Diversität der Lactobacillen auch mit zunehmenden Alter ein breites Spektrum von Lactobacillen Arten umfasst. Dieses Ergebnis beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der erhöhten Sensivität der PCR-DGGE, die durch eine erhöhte Zykluszahl während der PCR erreicht wurde. Im Einklang mit dieser Studie zeigt sich jedoch auch bei dieser Arbeit eine Veränderung der Lactobacillendiversität bei postmenopausalen Frauen im Vergleich zu schwangeren Frauen. Im Zuge einer Studie von Krondorfer, 2008, wurden rektal *L. iners*, *L. crispatus*, *L. reuteri* und *L. johnsonii / L. gasseri* und vaginal *L. iners* und *L. crispatus*, als dominat vorkommende Arten postuliert. Diese Arbeit identifiziert, im Einklang mit den Ergebnissen von Janitschek, 2010, für postmenopausale Probandinnen, innerhalb der eindeutig identifizierten *Lactobacillus* Arten für alle 3 Zeitpunkte in der Gesamtauswertung (rektal und vaginal) *L. gasseri* und *L. delbrueckii* als die am häufigsten vertretenen Arten, gefolgt von *L. crispatus, L. plantarum* und *L. jensenii.*

Petricevic et al., 2008, postuliert die Östrogen abhängige Kolonisation der Vagina mit Lactobacillen. Die, auf die Menopause folgende, urogenitale Atrophie ist mit einem signifikanten Sinken der Östrogensekretion assoziiert. Dies führt in weiterer Folge zu einer Dezimierung von Lactobacillen, zu einer Anhebung des pH Wertes und einer steigenden Kolonisation durch Enterokokken. (PETRICEVIC, 2008)

Es ist essentiell die Mechanismen, die zur Besiedelung der Vagina durch Lactobacillen führen, zu entschlüsseln um effiziente Probiotika Therapien zu entwickeln. Reid et al., 2003 und Morelli et. al, 2004, wiesen oral aufgenommene Lactobacillen nach der Darmpassage in der vaginalen Mikrobiota nach. Ebenso konnte Reid et al., 2003 in einer Studie an gesunden Frauen nachweisen, dass sich *L. rhamnosus* und *L. fermentum* nach oraler Einnahme vaginal ansiedeln und vermehren können. Eine weitere Studie von El Aila et al., 2009 zeigt, dass 44,4% der identifizierten

Lactobacillus-Arten sowohl in der Vagina als auch im Rektum vorkommen. Eine zusätzliche Funktion könnte den intestinalen Lactobacillen auch als Reservoir für die Stabilität der vaginalen Lactobacillen Mikrobiota zufallen. (El AILA, 2009)

Tab. 5-13: Übereinstimmungen der rektalen und vaginalen Mikrobiota (bezogen auf 43 Probandinnen für Tag 0 und Tag 14, und 38 Probandinnen für Tag 28)

Anzahl der Isolate	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Mittelwert (Tag 0,14,21)
0	32,6%	23,3%	13,2%	23,0%
1	16,3%	23,3%	21,1%	20,2%
2	20,9%	14,0%	23,7%	19,5%
3	16,3%	16,3%	18,4%	17,0%
4	7,0%	14,0%	15,8%	12,2%
5	2,3%	7,0%	5,3%	4,9%
6	2,3%	0,0%	2,6%	1,7%
7	2,3%	2,3%	0,0%	1,6%

Diese Ergebnisse konnten durch diese Arbeit nicht bestätigt werden. Wie aus Tabelle 5-11 hervorgeht, ist die Übereinstimmung zwischen den Abstrichen der rektalen und vaginalen Mikrobiota deutlich unter den von El Aila et al. 2009, postulierten 44,4%, ebenso wie die von Janitschek, 2010 nachgewiesenen 40%. Erwartungsgemäß sinkt der Grad der Übereinstimmung mit der identifizierten Anzahl der Lactobacillen Arten. Die größte Übereinstimmung findet sich zum Zeitpunkt 3 (Tag 28) mit 23,7% für zwei Lactobacillen Arten und zum Zeitpunkt 2 (Tag 14) für eine Lactobacillen Art. Im Mittel der einzelnen Probenahmezeitpunkte, liegt die größte Übereinstimmung zwischen rektaler und vaginaler Mikrobiota bei 20,2% für eine Lactobacillen Art.

Das primäre Ziel dieser Studie lag in der Analyse der Veränderung der Lactobacillendiversität bedingt durch die Einnahme eines Probiotikums, über einen Zeitraum von 14 Tagen. Rezente Studien, ANTONIO et al., 2009, GIL et al., 2010 und PETRICEVIC et al., 2008 belegen die Verbesserung der Qualität der vaginalen Lactobacillen Mikrobiota durch die Einnahme oraler Probiotika., wie *L. rhamnosus* GR-1 und *L. reuteri* RC-14.

Die Ergebnisse dieser Studie konnten die Wirksamkeit, auf Basis der untersuchten Parameter, des eingesetzten Probiotika jedoch nicht belegen. Wie in Tab. 5-14 ersichtlich, ist weder in der Diversität noch in der Quantität eine Steigerung der Lactobacillen Mikrobiota zu erkennen. Aufgrund der Ergebnisse die diese Studie lieferte ist es ebenfalls nicht möglich, eine Unterscheidung zwischen Probandinnen die das eingesetzte Probiotikum und Probandinnen die das Placbo eingenommen haben, vorzunehmen. Die Mikrobiota ist bei allen Probandinnen zu allen Zeitpunkten in Bezug auf Qualität und Quantität relativ gleich. Wobei die Ergebnisse der vaginalen Analysen eine leicht erhöhte Anzahl der dominaten Lactobacillen aufweisen.

Tab. 5-14: Vergleich der identifizierten Isolate nach phylogenetischen Gruppen (Felis und Delagio, 2007)

	Rektal			Vaginal		
	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 0	Tag 14	Tag 28
L. delbrueckii Gruppe	91	108	90	97	102	108
L. sakei Gruppe	19	21	23	29	30	25
L. casei Gruppe	34	30	33	33	37	35
L. plantarum Gruppe	17	14	16	12	17	14
L. reuteri Gruppe	0	0	0	0	1	1
L. salivarius Gruppe	1	3	1	0	1	1
Nicht eindeutig als *Lactobacillus* identifiziert	12	16	11	9	8	5
Ordnung *Lactobacilliales*	32	26	27	31	33	23
Klasse *Bacilli*	2	2	1	3	0	0
Ordnung *Bacillales*	1	3	1	6	2	1
Klasse *Gammaproteobacteria*	0	0	0	1	0	0
Nicht identifizierbar	0	0	0	1	1	1

Tab. 5-15: Vergleich der, zu verschiedenen Zeitpunkten, identifizierten rektalen Mikrobiota

Rektal	Vergleich Tag 0 und Tag 14 (in Zahlen)	Vergleich Tag 0 und Tag 28 (in Zahlen)	Vergleich Tag 14 und Tag 28 (in Zahlen)	Vergleich Tag 0 und Tag 14 (in %)	Vergleich Tag 0 und Tag 28 (in %)	Vergleich Tag 14 und Tag 28 (in %)
0%	0	1	1	0,0	2,9	2,7
>5%	0	0	0	0,0	0,0	0,0
>10%	1	0	0	2,5	0,0	0,0
>15%	0	0	0	0,0	0,0	0,0
>20%	0	1	0	0,0	2,9	0,0
>25%	2	1	2	5,0	2,9	5,4
>30%	2	0	2	5,0	0,0	5,4
>35%	1	2	2	2,5	5,7	5,4
>40%	0	0	0	0,0	0,0	0,0
>45%	1	1	3	2,5	2,9	8,1
>50%	3	2	1	7,5	5,7	2,7
>55%	3	3	0	7,5	8,6	0,0
>60%	4	4	4	10,0	11,4	10,8
>65%	4	3	2	10,0	8,6	5,4
>70%	0	7	6	0,0	20,0	16,2
>75%	1	1	5	2,5	2,9	13,5
>80%	4	2	5	10,0	5,7	13,5
>85%	2	3	0	5,0	8,6	0,0
>90%	6	3	1	15,0	8,6	2,7
>95%	0	0	1	0,0	0,0	2,7
100%	6	1	2	15,0	2,9	5,4

Vergleichende Clusteranalysen der, durch diese Studie untersuchten Lactobacillen Mikrobiota, zeigen das die Mikrobiota der einzelnen Probandinnen auch über einen relativ kurzen Zeitraum (28 Tage) signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung unterliegt. Die Tab. 5-15 und Tab. 5-16. zeigen die Übereinstimmungen der identifzierten Mikrobiota. Nur bei einer einzigen Probandin konnte eine 100% Übereinstimmung der vaginalen Mikrobiota während aller 3 Zeitpunkte nachgewiesen werden. Rektal finden sich die größten Übereinstimmungen zwischen zwei untersuchten Zeitpunkten zwischen 55% und 100%, während die größten Übereinstimmung von zwei vaginalen Zeitpunkten zwischen 65% und 100% liegen.

Tab. 5-16: Vergleich der, zu verschiedenen Zeitpunkten, identifizierten vaginalen Mikrobiota

Vaginal	Vergleich Tag 0 und Tag 14 (in Zahlen)	Vergleich Tag 0 und Tag 28 (in Zahlen)	Vergleich Tag 14 und Tag 28 (in Zahlen)	Vergleich Tag 0 und Tag 14 (in %)	Vergleich Tag 0 und Tag 28 (in %)	Vergleich Tag 14 und Tag 28 (in %)
0%	0	0	0	0,0	0,0	0,0
>5%	0	0	0	0,0	0,0	0,0
>10%	0	0	0	0,0	0,0	0,0
>15%	0	0	0	0,0	0,0	0,0
>20%	1	1	0	2,3	2,6	0,0
>25%	0	1	0	0,0	2,6	0,0
>30%	1	1	0	2,3	2,6	0,0
>35%	1	2	1	2,3	5,1	2,6
>40%	2	0	0	4,5	0,0	0,0
>45%	2	0	0	4,5	0,0	0,0
>50%	2	2	0	4,5	5,1	0,0
>55%	0	2	2	0,0	5,1	5,1
>60%	1	1	3	2,3	2,6	7,7
>65%	2	6	1	4,5	15,4	2,6
>70%	3	1	3	6,8	2,6	7,7
>75%	4	2	4	9,1	5,1	10,3
>80%	7	3	6	15,9	7,7	15,4
>85%	7	4	5	15,9	10,3	12,8
>90%	7	9	6	15,9	23,1	15,4
>95%	0	0	0	0,0	0,0	0,0
100%	4	4	8	9,1	10,3	20,5

Die PCR-DGGE wurde in den Voruntersuchungen zu dieser Studie von Krondorfer, 2008 und Janitschek, 2010 als sensitiver, als die Analysen, die mittels kulturabhängigen Methoden vorgenommen wurden, beschrieben. Trotz dieser erhöhten Sensitivität gibt es eine Reihe von Faktoren, sowohl in Bezug auf Aufbau und Durchführung der Studie, als auch in methodischer Hinsicht, die die Ergebnisse beeinflussen bzw. beeinflussen können. Diese sollen ebenfalls hier besprochen werden um eine kritische Betrachtung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Der wichtigste Faktor ist die orale Applikation des Probiotikums durch die Probandinnen selbst. Da die ordnungsgemäße und konsequente Einnahme nicht kontrolliert werden kann, ist hier ein

gewisser Unsicherheitsfaktor gegeben. Eine weitere wichtige Rolle spielt der Zeitraum zwischen Probenahme und Analyse. Dieser sollte so kurz wie möglich sein. Obwohl das Transportmedium das Überleben der Mikroorganismen so lange wie möglich zu gewährleisten soll und die kultivierungs-unabhängige Methode, der PCR-DGGE, sowohl die Analyse lebender als auch tote Mikroorganismen ermöglicht, führt eine zu lange Lagerung der Proben u.U. zum Einsetzen von Autolysemechanismen der Mikroorganismen.

Die DNA-Isolierung wurde nach sorgfältigen Voruntersuchungen, die in dieser Arbeit nicht behandelt werden, an verschiedensten Lactobacillen Arten durchgeführt. Diese Analysen ergaben, das die Lyse durch den gewählten DNA-Isolierungs Kit, bei einigen Lactobacillen Arten nicht oder nur teilweise funktionierte. Deswegen wurde bei dieser Studie zusätzlich Mutanolysin zugesetzt um die vollständige Lyse zu gewährleisten.

Ein weiterer bestimmender Faktor ist die PCR-DGGE. Trotz der offensichtlichen Vorteile, Die Erstellung von Profilen von bakteriellen Gemeinschaften, Analysen der bakteriellen Diversität, der Identifizierung einzelner Gattungen und Arten, die diese kultivierungs-unabhängige Fingerprintmethode bietet, birgt sie auch einige Nachteile, die die Ergebnisse beeinflussen können.

Die Effektivität der PCR ist vor allem von der Wahl der Polymerase abhängig. Verfügt diese über Korrekturmechanismen wird die Fehlerquote erheblich gesenkt. Weitere allgemein bestimmende Faktoren sind die Wahl des Puffersystems und ein optimales Verhältnis der Reagenzien. (KANAGAWA, 2003; COCOLIN und ERCOLINI, 2008)

Eine „Multitemplate PCR“, wie sie hier durchgeführt wurde, führt möglicherweise zu einem als „PCR Bias“ bezeichneten Phänomen, der Formierung von Artefakten und chimärer DNA. Die „PCR Bias“ bezeichnet die präferierte Amplifizierung einiger DNA-Sequenzen gegenüber anderen und beruht auf unterschiedlichen Bindungsenergien der Primer zu ihren Templates. Die Entstehung chimärer DNA wurde durch zwei Mechanismen postuliert. Einerseits kann die Hybridisierung von unvollständig verlängerten Primern, andererseits ein Phänomen das als „template switching“ bezeichnet wird und durch einen Wechsel des Matrizenmoleküls während der Elongationsphase der PCR herbeigeführt wird, zu chimärer DNA führen. Beide Phänomene können die Ergebnisse, in Bezug auf Quantität und Diversität verfälschen. (KANAGAWA, 2003; COCOLIN und ERCOLINI, 2008)

Ein weiterer Nachteil ist das die PCR als *in vitro* Methode zur DNA-Amplifizierung, vor allem von der Anzahl der Ausgangs DNA-Kopien abhängig. Gewöhnlich werden diejenigen DNA-Moleküle die zu Beginn am stärksten vertreten sind auch am erfolgreichsten amplifiziert. Sind von Anfang an nur wenige Kopien an Ausgangs-DNA vorhanden, ist es denkbar das die ersten Zyklen, die die weitere Entwicklung beeinflussen können, einer gewissen Zufälligkeit unterliegen. (KANAGAWA, 2003; COCOLIN und ERCOLINI, 2008)

Auch die Anzahl und Anordnung der zu untersuchenden Gene bzw. Sequenzen kann ein Grund für falsche Ergebnisse sein. Sequenzen innerhalb der 16S rRNA Gene, wie sie für diese Studie untersucht wurden kommen im Genom mehrmals vor. Die bei dieser Studie analysierten Arten, besitzen bis zu sechs verschiedene 16S RNA Gene, die in rrn Operons über das gesamte Lactobacillengenom verteilt vorliegen. Diese Heterogenität der rrn Operons führt zur einer Erhöhung der Ausgangskopienzahl und somit zu einer erhöhten Amplifizierung während der PCR. (KANAGAWA, 2003; COCOLIN und ERCOLINI, 2008)

Es ist weiterhin möglich das Fragmente trotz unterschiedlicher Sequenz gleiche „melting Profile“ besitzen und im DGGE-Gel als Einzelbande erscheinen. Dies, und die optische Auswertung, vor allem bei Proben mit großer Diversität kann Ergebnisse verfälschen. (KANAGAWA, 2003; COCOLIN und ERCOLINI, 2008)
Trotz dieser Nachteile ist die PCR-DGGE eine effektive und kostengünstige Methode der Molekularbiologie um rasche Ergebnisse bei der Analyse der Diversität in bakteriellen Gemeinschaften zu erzielen.

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis für das komplexe Zusammenspiel des menschlichen Organismus und der humanen Mikrobiota erheblich erweitert. Der Mensch wird nunmehr als „Super-Organismus“, als ein Verband humaner, somatischer Zellen und seiner spezifischen Mikrobiota betrachtet und verstanden. Milchsäurebakterien, im Besonderen Lactobacillen zählen, neben einigen Anderen, wie *Escherichia coli* zu den wichtigsten Symbionten der Mikrobiota des Menschen und spielen eine wichtige Rolle für die menschlichen Gesundheit. Eine besondere Rolle spielen hierbei die Lactobacillen der vaginalen Mikrobiota. Mit zunehmendem Alter sinkt die Anzahl der Lactobacillen in diesem Habitat jedoch dies und führt zu einer gesteigerten Exposition für verschiedene urogenital Krankheiten bei Frauen. Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von Probiotika sowohl für die Wiederherstellung der Gesundheit als auch zur Optimierung der vaginalen Mikrobiota. Die positiven Effekte, die der therapeutische Einsatz von Probiotika auf den menschlichen Organismus hat, wurden mehrfach klinisch nachgewiesen. Sie decken sich weitgehend mit den Funktionen, die die normale Lactobacillenmikrobiota eines gesunden Individuums erfüllt. Ein detailliertes Verständnis für die Diversität des humanen Mikrobiota, und der Faktoren, die dessen Komponenten und Distribution beeinflussen, könnte neue Wege zur Erhaltung der menschlichen Gesundheit aufzeigen.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden Abstriche von 44 Probandinnen, im Alter zwischen 55 und 65 Jahren untersucht aus zwei verschiedenen humanen Habitaten untersucht. Die Probandinnen nahmen über einen Zeitraum von 14 Tagen oral ein Probiotikum bzw. ein Placebo zu sich. Von jeder Probandin wurden, zu drei verschiedenen Zeitpunkten, Tag 0, Tag 14 und Tag 28, je ein rektaler und ein vaginaler Abstrich genommen. Zunächst wurde eine semiquantitative Keimzahlbestimmung durchgeführt. In Folge wurde jeder Abstrich, mittels PCR-DGGE und anschließender Sequenzierung ausgewählter Einzelbanden, analysiert. Bei den am häufigsten vorkommenden Arten in beiden Habitaten und zu allen Zeitpunkten, handelt es sich um *L. gasseri* und *L. delbrueckii* gefolgt von *L. crispatus, L. plantarum* und *L. jensenii.* Ein Vergleich zwischen rektal und vaginal identifizierten Arten ergab, im Gegensatz zu rezenten Studien, eine weit geringere Übereinstimmung der Lactobacillen Mikrobiota. Desweiteren konnte keine Veränderung der Lactobacillen Mikrobiota aufgrund der Einnahme des Probiotikums nachgewiesen werden. Vergleichende Clusteranalysen der Ergebnisse der verschiedenen Zeitpunkte und Habitate zeichnen im Verlauf von 28 Tagen ein dynamisches Bild der identifizierten vaginalen und rektalen Milchsäurebakterien-Mikrobiota.

7. Abstract

The understanding of the complex interaction between the human organism and its microbiota has been increasing during the past years. Henceforth, the human organism is understood and considered as „Super-organism“, an assembly of human, somatic cells and it’s specific microbiota. Lactic Acid Bacteria, especially lactobacilli among other species, such as *Escherichia coli*, are the most important symbionts of the human microbiota and play an important role for human health. In particular, Lactobacilli of the vaginal microbiota are of signifikant importance. Their number decreases with growing age within this habitat, which leads to an increased exposure for urogenital deseases in women. On this account the development of Lactobacilli-based probiotics is of significant interest for the restoration of women’s health and the improvement of the vaginal microbiota. Positive effects of the therapeutic use of probioitcs were clinically verified several times. These effects correspond with the natural features of the normal microbiota of a healthy individuum. A detailed understanding of the human microbiota diversity, and their determining parameter could reveal new paths for maintenance human’s health.

In course of this thesis, smears of 44 subjects between the age of 55 and 65 were examined. These subjects have been taking a probiotic respectively a placebo over a period of 14 days. Rectal and vaginal smears have been taken at three different timepoints, day 0, day 14 and day 28. Initially a semiquantitative determining colony count was performed. Each smear was examined using PCR-DGGE with subsequent sequence analysis of selected bands. The results show that the dominant species are *L. gasseri* and *L. delbrueckii* followed by *L. crispatus, L. plantarum* and *L. jensenii.* Direct comparison between rectal and vaginal identified species revealed, in contrast to recent studies, a lower concordance of the lactobacilli microbiota.
A change of the Lactobacilli microbiota on account of the probiotic could not be observed. Comparing clusteranalysis of the results of the different habitats and timepoints revealed a dynamic picture of the rectal and vaginal Lactic Acid Bacteria microbiota over a period of 28 days.

8. Literatur

ABAD C.L., SAFDAR N.: The role of lactobacillus probiotics in the treatment or prevention of urogenital infections-a systematic review. Journal of Chemotherapie 21(3), pp.243-52 (2009)

AGUIRRE M. und COLLINS M.D.: Lactic acid bacteria and human clinical infection. Journal of Applied Bacteriology 75, pp. 95-107 (1993)

ANTONIO M.A.D., MEYN L.A., MURRAY P.J., BUSSE B. und HILLIER S.L.: Vaginal colonization by probiotc *Lactobacillus crispatus* CTV-05 is decreased by sexual activity and endogenous Lactobacilli. Journal of Infectious Diseases 199, pp. 1506-1513 (2009)

ANUKAM K.C. und REID G.: Organisms associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequence. African Health Science 7 (2), pp. 68-72 (2007)

ARUMUGAM M., RAES J., PELLETIER E.,LE PASLIER D.,YAMADA T., MENDED.R., FERNADES G. R.,TAP J., BRUL T., BATTO JM., BERTALAN M., BORRUEL N., CASELLAS F., FERNADEZ L., GAUTIER L., HANSEN T., HATTORI M., HAYASHI T., KLEEREBEZEM M., KUROKAWA K., LECLERC M., LEVENEZ F., MANICHANH C., NIELSEN HB.,NIELSEN T., PONS N., POULAIN J., QIN J., SIHERITZ-PONTEN T., TIMS S., TORRENTS D., UGARTE E., ZOETENDAL EG., WANG J., GUARNER F., PEDERSEN O.,VOS W.M.de, BRUNAK S., DORE´J., MetaHIT Consortium, WEISSENBAHC J., Ehrlich S. und BORK P.:Enterotypes of the human gut Mikrobiome. Nature 473, pp.174-180m (2011)

BARKER K.: Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch für Einsteiger. 1. Auflage, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München (2006)

BÄCKHED F., LEY R.E: SONNENBURG J.L., PETERSON D.A. und GORDON J.I.: Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science 307, pp.1915-1920 (2005)

BERNARDEAU M., VERNOUX J.P., HENRI-DUBERNET S.H. und GUÉGUEN M.:
Safety assessment of dairy microorgansims: The Lactobacillus genus. International Journal of Food Microbiology 126 (3), pp.278-285 (2008)

BERNARDEAU M., GUGUEN M. und VERNOUX J.P.: Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiology Review 30, pp. 487-513 (2006)

CANCHAYA C., CLAESSON M.J., FITZGERALD G.F., van SINDEREN D. und O'TOOLE P.W.: Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. Microbiology 152, pp. 3185–3196 (2006)

CANNON J.P., LEE T.A., BOLANOS J.T. und DANZINGER L.H.: Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: A retrospective review of over 200 cases. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease 24, pp. 31-40 (2005)

COCOLIN L., ERCOLINI D.: Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. (2008)

DIEP D.B., MATHIESEN G., EIJSINK V.G.H und NES I.F: Use of Lactobacilli and their Pheromone-Based Regulatory Mechanism in Gene Expression and Drug Delivery. Current Pharmaceutical Biotechnology 10, pp. 62-73 (2009)

DONATI L., Di VICO A., NUCCI M., QUAGLIOZZI L., SPAGNUOLO T., LABIANCA A., BRACAGLIA M., IANNIELLO F., CARUSO A. und PARADISI G.: Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. Archieves of Gynecology and Obstetrics 281, pp. 589-600 (2010)

Eckburg P. B., Bik E. M.,2 Bernstein C. N.,Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M.,Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Science 308, pp. 1635-1638 (2005)

EL AILA N.A., TENCY I., CLAEYS G., VERSTRAELEN H., SAERENS B., LOPES dos SANTOS SANTIAGO G., De BACKER E., COOLS P., TEMMERMAN M., VERHELST R. und VANEECHOUTTE M.: Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. BMC Infectious Diseases 9, pp. 167-181 (2009)

EIJSINK V.G.H., AXELSSON L., DIEP D.B, HÅVARSTEINL.S, HOLO H. und NES I.F: Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie van Leeuwenhoek 81, pp. 639–654 (2002)

ERCOLINI D.: PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological Methods 56, pp. 297-314 (2004)

EUZÉBY J. P.: List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Society for Systematic and Veterinary Bacteriology, 1997

FAKHRY S., MANZO N., D´APUZZO E., PIETRINI L., SORRENTINI I., RICCA E., De FELICE M. und BACCIGALUPI L.: Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. Research in Microbiology 160, pp. 817-823 (2009)

FELIS G.E. und DELLAGLIO F.: Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. Current Issues in Intestinal Microbiology 8, pp. 44–61 (2007)

Fredricks, D.N.: Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal Mikrobiota. Anaerobe (2011)

GENC M.R., ONDERDONK A.: Endogenous bacterial flora in pregnant women and the influence of maternal genetic variation. BJOG: An international Journal of Obstetrics & Gynaecology 118(2), pp.154-63 (2011)

GIL N.F., MARTINEZ R.C.R., GOMES B.C., NOMIZO A. und De MARTINIS E.C.P.: Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. Brazilian Journal of Microbiology 41 (1), pp. 6-14 (2010)

HAMMES W.P. und HERTEL C.: The genera *Lactobacillus* und *Carnobacterium*. Prokaryotes 4, pp. 320–403 (2006)

HILL, D.A. und ARTIS D.: Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. Annual Review of Immunology 28, pp. 623-667 (2010)

JANITSCHEK, C.: Detaillierte Analyse humaner Lactobacillenhabitate. Diplomarbeit, Universität Wien (2010)

KANAGAWA, T.: Bias and Artefacts in Multitemplate Polymerase Chain Reactions. Journal of Bioscience and Bioengineering 96, pp. 317.323 (2003)

KLEEREBEZEM M., HOLS P., BERNARD E., ROLAIN T., ZHOU M., SIEZEN R.J. und BRON P.A.: The extracellular biology of the lactobacilli. FEMS Microbiology Reviews 34, pp. 199-230 (2010)

KRONDORFER I.: Molekulare Analyse der Biodiversität von Lactobacillen in verschiedenen humanen Habitaten. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur (2008)

LAMONT R.F., SOBEL J.D., AKINS R.A., HASSAN S.S., CHAIWORAPONGSA T., KUSANOVIC J.P., ROMERO R.:The vaginal Mikrobiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 118, Issue 5 (2011)

MARTIN R. und SUÁREZ J.E.: Biosynthesis and degradation of H^2O^2 by vaginal lactobacilli. Applied and Environmental Microbiology 76 (2), pp. 400-405 (2010)

MARTINEZ R.C.R., FRANCESCHINI S.A., PATTA M.C., QUINTANA S.M., NUNES Á.C., MOREIRA J.L.S., ANUKAM K.C., REID G. und De MARTINIS E.C.P.: Analysis of vaginal Lactobacilli from healthy and infected brazilian women. Applied and Environmental Microbiology 74 (14), pp. 4539-4542 (2008)

MACFARLANE S. und DILLON J.F: Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology 102, pp. 1187–1196 (2007)

MCLOUGHLIN R.M. und MILLS K.H.G.: 2011 Influence of gastrointestinal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. The Journal of Allergy and clinical Immunology 127 (5), pp. 1097-1107 (2011)
MERK K., BORELLI C. und KORTING H.C.: Lactobacilli – bacteria-host interactions with special regard to the urogenital tract. International Journal of Medical Microbiology 295, pp. 9-18 (2005)

Morelli L., postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. Journal of nutrition 138, pp. 1791-1795 (2008)

MULDER I.E., SCHMIDT B., STOKES C.R., LEWIS M., BAILEY M., AMINOV R.I., PROSSER J.I., GILL B.P., PLUSKE J.R., MAYER C.-D., MUSK C.C. und KELLY D.: Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. BMC Biology 7, pp. 79-99 (2009)

MUYZER G. and SMALLA K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. Antonie van Leeuvenhoeck 73, pp. 127-141 (1998)

NUGENT R.P., KROHN M.A. und HILLIER S.L.: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. Journal of Clinical Microbiology 29 (2), pp. 297-301 (1991)

Ojetti V, Gigante G, Gabrielli M, Ainora ME, Mannocci A, Lauritano EC, Gasbarrini G, Gasbarrini A.: The effect of oral supplementation with Lactobacillus reuteri or tilactase in lactose intolerant patients: randomized trial. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 14 (3) pp. 163-70 (2010)

OXOID (Hrsg.): OXOID Handbuch, 2003

PALMER C., BIK E.M, DIGIULIO D.B., RELMAN D.A., BROWN P.O.Development of the human infant intestinal Mikrobiota. PloS Biol. 2007.

PETRICEVIC L., UNGER F.M., VIERNSTEIN H. und KISS H.: Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 141, pp. 54-57 (2008)

PICHHARDT K.: Lebensmittelmikrobiologie, Grundlagen für die Praxis. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1998)

QIN J., LI R., RAES J., ARUMUGAM M., BURGDORF K.S., MANICHANH C., NIELSEN T., PONS N., LEVENEZ F., YAMADA T., MENDE D.R., LI J., XU J., LI S., LI D., CAO J., WANG B., LIANG H., ZHENG H., XIE Y., TAP J., LEPAGE P., BERTALAN M., BATTO J.-M., HANSEN T., Le PASLIER D., LINNEBERG A., NIELSEN H.B., PELLETIER E., RENAULT P., SICHERITZ-PONTEN T., TURNER K., ZHU H., YU C., LI S., JIAN M., ZHOU Y., LI Y., ZHANG X., LI S., QIN N., YANG H., WANG J., BRUNAK S., DORÈ J., GUARNER F., KRISTIANSEN K., PEDERSEN O., PARKHILL J., WEISSENBACH J., MetaHIT Consortium, BORK P., EHRLICH S.D. und WANG J.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature Vol. 464, pp. 59-67 (2010)

RINTTILÄ T., KASSINEN A., MALINEN E., KROGIUS L. und PALVA A.: Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology 97, pp. 1166-1177 (2004)

SANDERS M.E.: Probiotics: definition, sources, selection and uses. Clinical Infectious Diseases 46, pp. 58-61 (2008)

SCHILLINGER U. und HOLZAPFEL W.H.: Culture media for lactic acid bacteria. In: CORRY J. E. L., CURTIS G. D. W. und R. M. BAIRD (Hrsg.): Handbook of culture media for food microbiology 37, Chapter 8, pp. 127 – 145 (2003)

SCHREZENMEIR J. und DE VRESE M.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 73, No. 2, pp. 361-364 (2001)

Srinivasan S., Liu C, Mitchell C.M., Fiedler T.L., Thomas K.K., Agnew K.J., Marrazzo J.M., Fredricks D.N.: Temporal Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis. PLoS ONE 5(4), pp.1-8 (2010)

STILES M.E. und HOLZAPFEL W.H.: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology 36, pp. 1–29 (1997)

TURNBAUGH P.J, LEY R.E., HAMADY M. FRASER-LIGGETT C.M., KNIGHT R., GORDON J.I.: The Human Mikrobiome Project. Nature 449, pp. 804-810 (2007)

VAN HYLCKAMA VLIEG J.E.T., RADEMAKER J.L.W, BACHMANN H., MOLENAAR D., KELLY W.J. und SIEZEN R.J.: Exploiting natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis* for innovations in food fermentations. Current Opinion in Biotechnology 20;17;183–190 (2006)

WALTER J., HERTEL C., TANNOCK G.W., LIS C.M., MUNRO K. und HAMMES W.P.: Detection of *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 67, pp. 2578–2585 (2001)

WEGKAMP A., TEUSINK B., DE VOS W.M. und SMID E.J.: Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. Letters in Applied Microbiology (2009)

WHO: Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May 2002

YAMAMOTO T., ZHOU X., WiILLIAMS C.J., HOCHWALT A., FORNEY L.J: Bacterial Populations in the Vaginas of Healthy Adolescent Women. Journal of Pediatric Adolescent Gynecology 22, pp.11-18(20

9. Anhang

9.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
1/1c	0,00E+00	nicht erhalten	N.E
1/2c	6,20E+06	nicht erhalten	N.E
1/3c	2,84E+06	nicht erhalten	N.E
2/1c	6,48E+06	*+ L. sakei group* *+ L. gasseri* *+ L. jensenii* *+ L. crispatus* *+ L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
2/2c	1,00E+07	*+ L. sakei group* *+ L. sakei* *+ Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* *+ L. crispatus* *+ L. delbrueckii*	positiv
2/3c	0,00E+00	nicht vorhanden.	N.E
3/1c	3,21E+06	*+ L. rhamnosus* *+ Leuconostoc spp. od. L. parabuchneri* *+ L. plantarum* *+ L. sakei group od. Lactococcus spp.* *+ Weissella spp.* *+ L. crispatus*	positiv
3/2c	5,15E+06	*+ Staphylococcus spp. od. Planomicrobium spp.* *+ L. rhamnosus* *+ L. gasseri* *+ Carnobacterium spp.* *+ Leuconostoc citreum*	positiv
3/3c	1,30E+04	*+ L. gasseri* *+ L. jensenii* *+ Leuconostoc citreum* *+ L. sakei group od. Lactococcus spp.* *+ L. casei group*	positiv
4/1c	1,50E+02	*+ L. sakei group* *+ Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* *+ L. jensenii* *+ L. delbrueckii* *+ Leuconostoc spp.* *+ L. sakei group od. Lactococcus spp.*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
4/2c	1,26E+04	+ *Staphylococcus spp. od. Planomicrobium spp.* + *L. plantarum* + *L. sakei group* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. sakei group od. Lactococcus spp.*	positiv
4/3c	6,40E+03	+ *L. delbrueckii group 1* + *L. gasseri* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
5/1c	1,26E+07	+ *2x L. delbrueckii group 1* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. delbrueckii*	positiv
5/2c	7,50E+02	+ *2x L. delbrueckii group 1* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. delbrueckii*	positiv
5/3c	3,00E+06	+ *2x L. sakei group* + *L. sakei* + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. delbrueckii group 1* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
6/1c	1,40E+07	+ *L. sakei group* + *Staphylococcus spp. od. Planomicrobium spp.* + *Leuconostoc lactis* + *Leuconostoc spp.*	Positiv
6/2c	9,90E+03	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Carnobacterium spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
6/3c	1,32E+04	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Carnobacterium spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3* + *L. casei group*	Positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
7/1c	3,44E+07	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.*	Positiv
7/2c	1,04E+03	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. crispatus* + *Leuconostoc spp.* + *L. sakei group od. Lactococcus spp.*	Positiv
7/3c	0,00E+00	nicht vorhanden.	N.E
8/1c	4,06E+07	+ *L. plantarum* + *L. sakei group* + *L. gasseri* + *Carnobacterium spp.* + *L. delbrueckii* + *L. sakei group od. Lactococcus spp.* + *L. casei group*	Positiv
8/2c	1,29E+03	+ *L. delbrueckii group 1* + *L. gasseri* + *L .jensenii* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
8/3c	0,00E+00	nicht vorhanden.	N.E
9/1c	4,50E+06	+ *Leuconostoc lactis* + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. delbrueckii* + *Staphylococcus spp.* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
9/2c	5,29E+06	+ *Leuconostoc spp. od. L. parabuchneri* + *L. gasseri* + *Leuconostoc citreum* + *Staphylococcus spp.* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
9/3c	2,67E+03	+ *L. sakei group* + *L. gasseri* + *Carnobacterium spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
10/1c	5,20E+06	+ *L. johnsonii* + *L. gasseri* + *Leuconostoc citreum* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
10/2c	3,45E+02	+ *L. johnsonii* + *L. gasseri* + *Leuconostoc citreum* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
10/3c	8,05E+02	+ *L .johnsonii* + *L. gasseri* + *Leuconostoc citreum* + *L. crispatus* + *L. sakei group od. Lactococcus spp.*	positiv
11/1c	0,00E+00	+ *L. plantarum* + *2x L.delbrueckii group 1* + *L. gasseri* + *Leuconostoc citreum* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L.paracasei 3*	positiv
11/2c	8,80E+03	+ *L. plantarum* + *2x L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *Leuconostoc citreum* + *L. rhamnosus/L.paracasei 3*	positiv
11/3c	1,92E+05	+ *L. plantarum* + *2x L. delbrueckii* group *1* + *L. sakei* + *L. gasseri* + *Leuconostoc citreum* + *L.rhamnosus/L.paracasei 3*	positiv
12/1c	0,00E+00	+ *L. plantarum* + *2x L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L .rhamnosus/L.paracasei 3*	positiv
12/2c	1,37E+06	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L.paracasei 3*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
12/3c	2,22E+04	+ *L. sakei* + *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *Leuconostoc spp.* + *L. rhamnosus/L.paracasei 3*	positiv
13/1c	4,00E+07	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L.paracasei 3*	positiv
13/2c	9,29E+05	+ *Leuconostoc lactis* + *Leuconostoc spp. od. L. parabuchneri* + *L. sakei* + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
13/3c	5,32E+06	+ *Leuconostoc lactis* + *L. rhamnosus* + *L. delbrueckii* group *1* + *Carnobacterium spp.* + *L. crispatus* + *Leuconostoc spp.*	positiv
14/1c	2,68E+06	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *2x L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
14/2c	3,70E+02	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *2x L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
14/3c	6,21E+05	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *Carnobacterium spp.* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. delbrueckii* group *2* + *Leuconostoc spp.*	positiv
18/1c	1,01E+06	+ *L. sakei* group + *L. plantarum* + *L. delbrueckii* group *1*	positiv
18/2c	9,05E+02	+ *L. rhamnosus* + *L. plantarum* + *L. delbrueckii* group *1*	positiv
18/3c	4,00E+01	+ *Leuconostoc spp. od. L. parabuchneri* + *L. plantarum* + *L. johnsonii*	positiv
19/1c	1,12E+03	+ *L. rhamnosus* + *Leuconostoc spp. od. L. parabuchneri* + *L. plantarum* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. rhamnosus/+ L. paracasei 3*	positiv
19/2c	3,38E+07	+ *Staphylococcus spp. od. Planomicrobium spp.* + *L. rhamnosus* + *Leuconostoc spp. od. L. parabuchneri* + *Carnobacterium spp.* + *Staphylococcus spp.* + *L. rhamnosus/+ L. paracasei 3*	positiv
19/3c	5,19E+07	+ *Staphylococcus spp. od. Planomicrobium spp.* + *L. rhamnosus* + *Leuconostoc spp. od.* + *L. parabuchneri* + *L. plantarum* + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. rhamnosus/+ L. paracasei 3*	positiv
20/1c	3,77E+07	+ *L.delbrueckii*	positiv
20/2c	1,62E+03	+ *L.delbrueckii*	positiv
20/3c	3,54E+06	+ *L. jensenii*	positiv
21/1c	0,00E+00	Kein Ergebnis	positiv
21/2c	7,65E+05	+ *L. delbrueckii* group *1* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
21/3c	7,32E+04	+ *2x L. delbrueckii* group *1* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
22/1c	1,04E+04	+ *L. plantarum* + *2x L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. rhamnosus L. paracasei 3* + *L. casei* group	positiv
22/2c	6,35E+04	+ *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
22/3c	3,66E+06	+ *L. plantarum* + *2x L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
23/1c	9,95E+06	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group	positiv
23/2c	2,92E+08	+ *L. plantarum*	positiv
23/3c	1,31E+06	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *Staphylococcus spp.* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
24/1c	2,39E+06	+ *L. plantarum* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
24/2c	3,80E+02	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
24/3c	4,03E+05	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.* + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* group *2* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
25/1c	1,39E+06	+ *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
25/2c	1,78E+06	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. salivarus*	positiv
25/3c	3,70E+05	+ *L. rhamnosus* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* group *2* + *L. salivarus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
26/1c	6,20E+06	+ *L. rhamnosus* + *L. johnsonii* + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Carnobacterium spp.* + *L. jensenii* + *Leuconostoc citreum* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
26/2c	4,40E+07	+ *Leuconostoc spp. od. L. parabuchneri* + *L. jensenii* + *Leuconostoc citreum* + *L. delbrueckii* + *L. paracasei* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
26/3c	1,84E+07	+ *L. plantarum* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *Leuconostoc citreum* + *L. delbrueckii* group *2*	Positiv
27/1c	2,66E+06	+ *L. sakei* group + *Leuconostoc lactis* + *L. plantarum* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.* + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Weissella spp.*	Positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
27/2c	2,60E+07	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
27/3c	2,01E+05	+ *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
28/1c	1,10E+02	+ *2x L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
28/2c	1,59E+06	+ *L.gasseri* + *2x L.delbrueckii*	Positiv
28/3c	1,10E+07	+ *L. gasseri* + *L. iners* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
29/1c	1,68E+08	+ *L. sakei* group + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	Positiv
29/2c	1,40E+04	+ *L. sakei* group + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. crispatus* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	Positiv
29/3c	6,80E+06	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
30/1c	1,87E+06	+ *L. sakei* group + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Carnobacterium spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.* + *L. casei* group	Positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
30/2c	1,63E+07	+ *L. delbrueckii* + *L. ruminis*	Positiv
30/3c	0,00E+00	nicht vorhanden.	nicht vorhanden.
31/1c	3,16E+04	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *Leuconostoc spp.* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
31/2c	1,34E+04	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3* + *L. casei* group	positiv
31/3c	1,49E+05	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
32/1c	4,18E+06	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3* + *L. casei* group	positiv
32/2c	1,96E+06	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *Carnobacterium spp.* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. sakei group od. Lactococcus spp.* + *L. casei group*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
32/3c	3,70E+06	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.* + *L. casei* group	Positiv
33/1c	1,90E+07	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Carnobacterium spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. delbrueckii* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.* + *L. casei* group	Positiv
33/2c	1,22E+07	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *2x L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	Positiv
33/3c	2,08E+05	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
34/1c	9,45E+04	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
34/2c	5,30E+02	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
34/3c	0,00E+00	nicht vorhanden.	Nicht vorhanden.
35/1c	3,37E+04	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
35/2c	4,70E+05	+ *L. johnsonii* + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
35/3c	2,05E+04	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
36/1c	1,81E+03	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Leuconostoc citreum* + *Staphylococcus spp.* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
36/2c	1,11E+07	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. salivarus* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
36/3c	1,57E+06	+ *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *Carnobacterium spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. delbrueckii* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
37/1c	8,45E+04	Kein Ergebnis	positiv
37/2c	1,05E+05	+ *L. plantarum* + *L. gasseri* + *Carnobacterium spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
37/3c	4,85E+05	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *Carnobacterium spp.* + *Leuconostoc citreum* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
38/1c	1,06E+04	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *Carnobacterium spp.* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
38/2c	1,03E+07	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
38/3c	7,85E+07	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
39/1c	1,39E+04	+ *L. sakei* group + *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* + *L. ruminis* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
39/2c	4,05E+03	+ *L. sakei* group + *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri*	positiv
39/3c	2,22E+04	+ *L. plantarum* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
40/1c	1,27E+05	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
40/2c	0,00E+00	+ *L. sakei* group + *L. plantarum* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
40/3c	1,27E+06	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
41/1c	1,61E+06	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
41/2c	8,65E+05	+ *Leuconostoc lactis* + *L. rhamnosus* + *L. sakei* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *Leuconostoc citreum* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
41/3c	2,17E+06	+ *Leuconostoc lactis* + *L. sakei* group + *L. sakei* + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv
42/1c	1,10E+06	Kein Ergebnis	Negativ
42/2c	1,25E+05	Kein Ergebnis	Negativ
42/3c	1,07E+07	Kein Ergebnis	Negativ
43/1c	4,55E+04	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. delbrueckii*	Positiv
43/2c	3,25E+07	+ *Leuconostoc spp. od. L. parabuchneri* + *Leuconostoc lactis* + *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. delbrueckii*	Positiv
43/3c	1,82E+06	+ *L. sakei* group + *Leuconostoc spp. od. Lactococcus spp. od. Lactobacillus spp.* + *L. delbrueckii* group *1* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	Positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
44/1c	1,40E+07	+ *L. plantarum* + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3* + *L. casei* group	positiv
44/2c	3,04E+07	+ *L. plantarum* + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3* + *L. casei* group	positiv
44/3c	2,25E+07	+ *L. plantarum* + *L. sakei* group + *L. johnsonii* + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
46/1c	1,48E+07	+ *L. plantarum* + *L. gasseri* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
46/2c	5,05E+06	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.*	positiv
46/3c	2,81E+05	+ *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. iners* + *L. paracasei* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv
47/1c	3,37E+03	+ *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *Leuconostoc citreum* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	negativ
47/2c	6,65E+04	+ *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	positiv

Probe	KZ	Lactobacillen	Enterokokken
47/3c	1,22E+05	+ *L. delbrueckii* group *1* + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *Leuconostoc citreum* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3*	negativ
50/1c	2,10E+07	+ *L. sakei* group + *L. sakei* group *od. Lactococcus spp.* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3* + *L. casei* group	positiv
50/2c	1,05E+08	+ *L. sakei* group + *L. gasseri* + *L. jensenii* + *L. crispatus* + *L. delbrueckii* + *L. rhamnosus/ L. paracasei 3*	positiv
50/3c	9,65E+07	+ *L. gasseri* + *L. jensenii* + *Leuconostoc citreum* + *L. rhamnosus/L. paracasei 3* + *L. casei* group	positiv

9.2. DGGE Gele - Referenz für Bionumerics

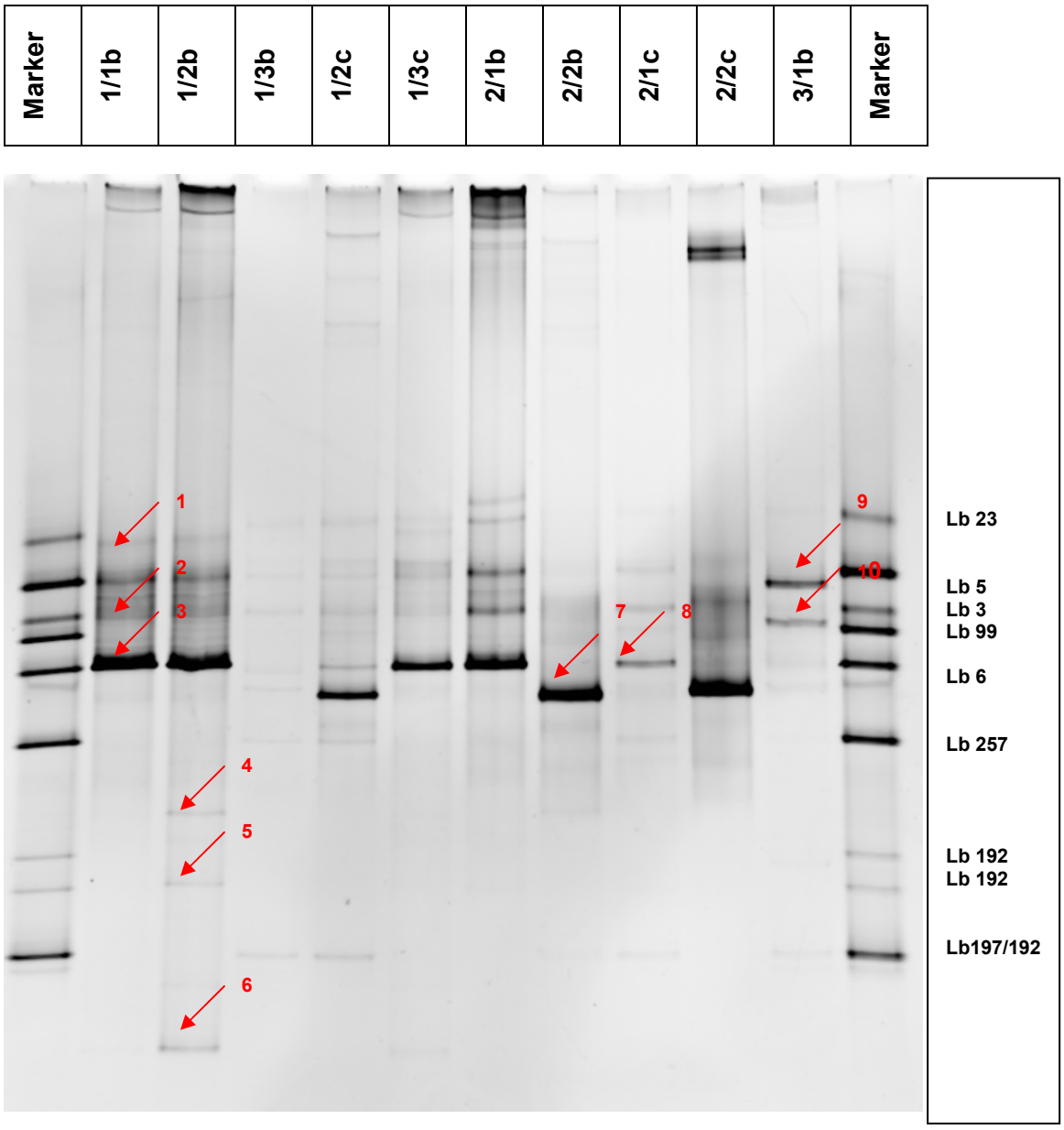

Abb. 9-1: DGGE-Gel 1: Proben 1/1b-3/1b

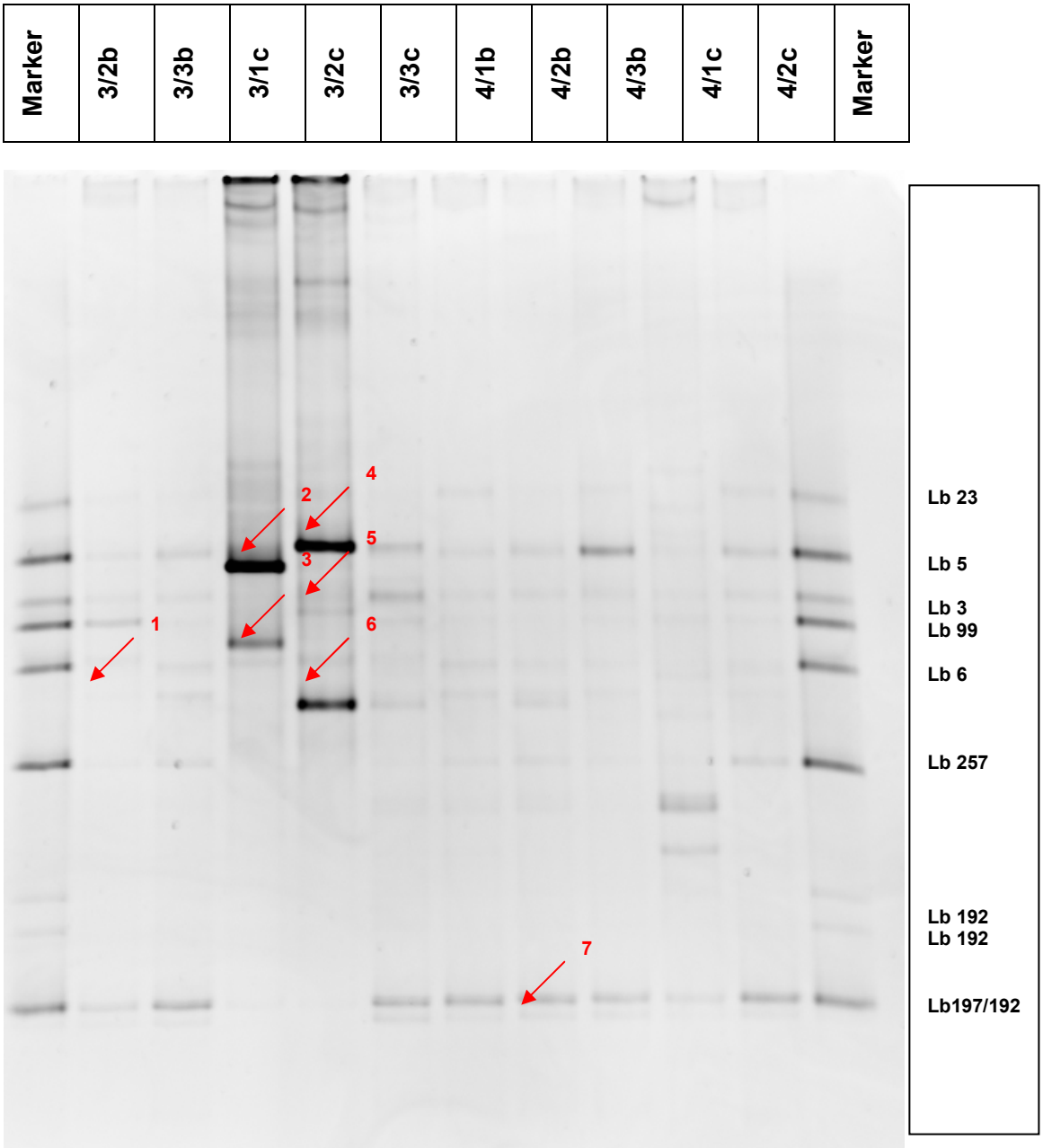

Abb. 9-2: DGGE – Gel 2: Proben 3/2b-4/2c

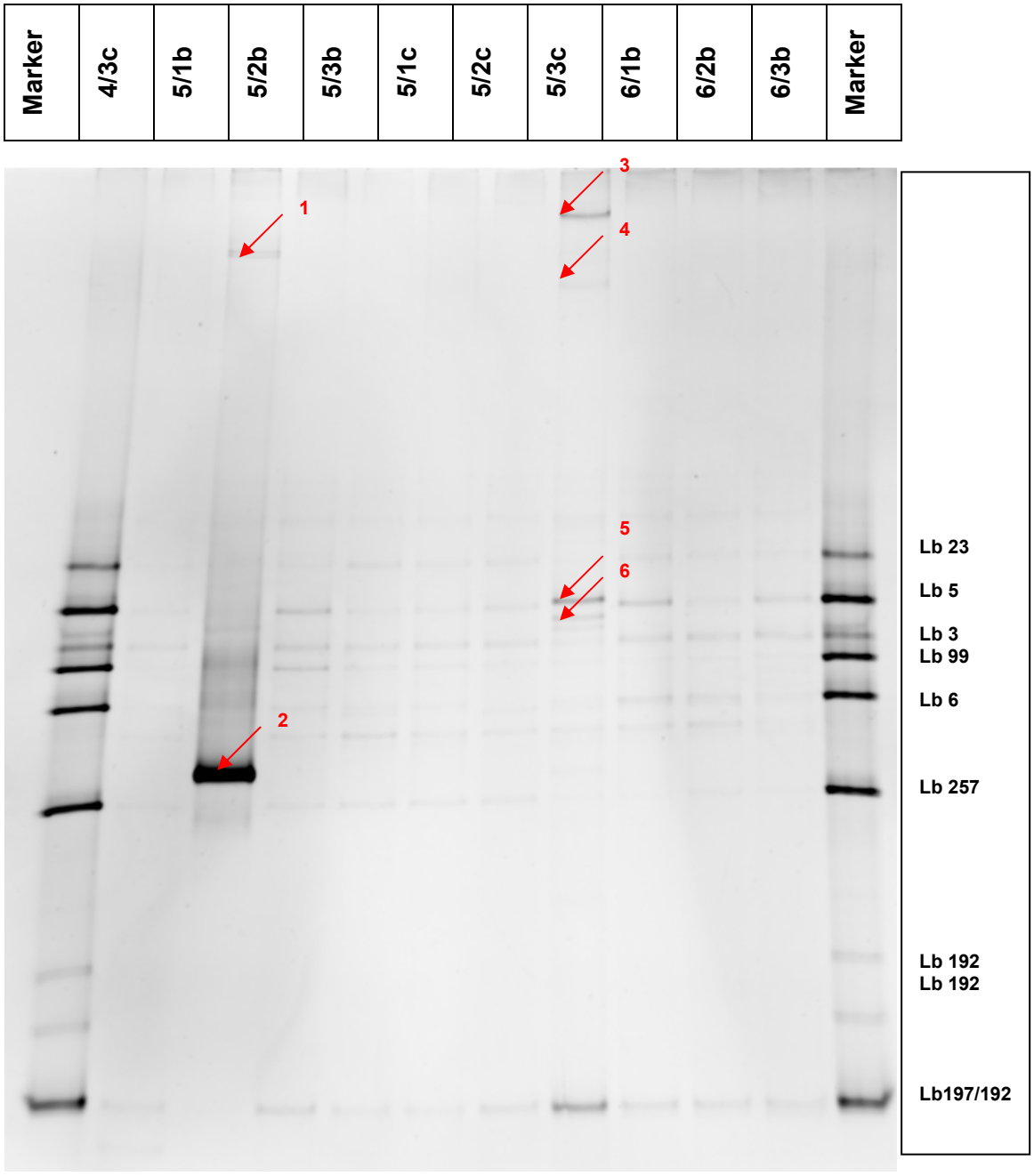

Abb. 9-3: DGGE – Gel 3:Proben 4/3c-6/3b

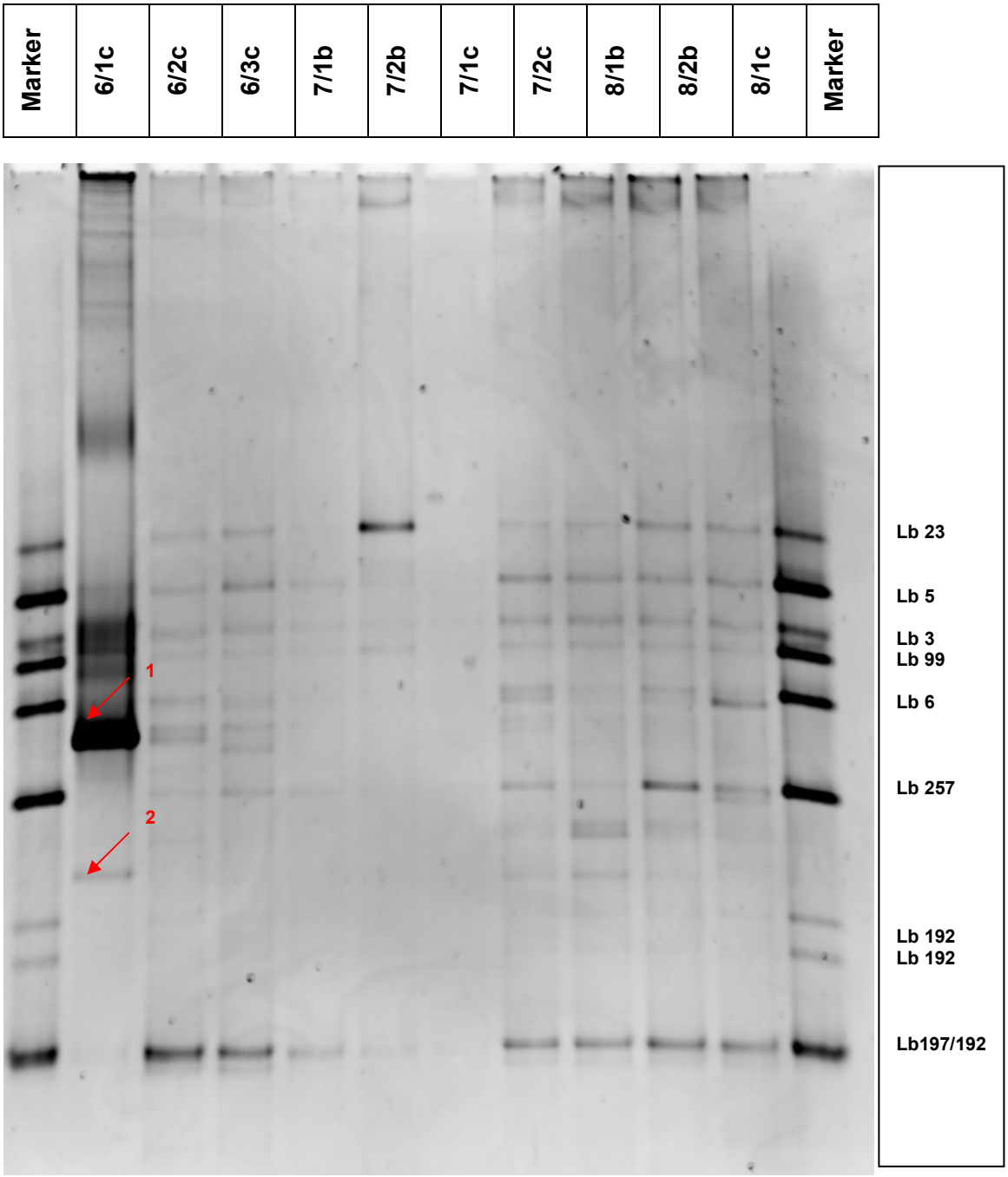

Abb. 9-4: DGGE – Gel 4: Proben 6/1c-8/1c

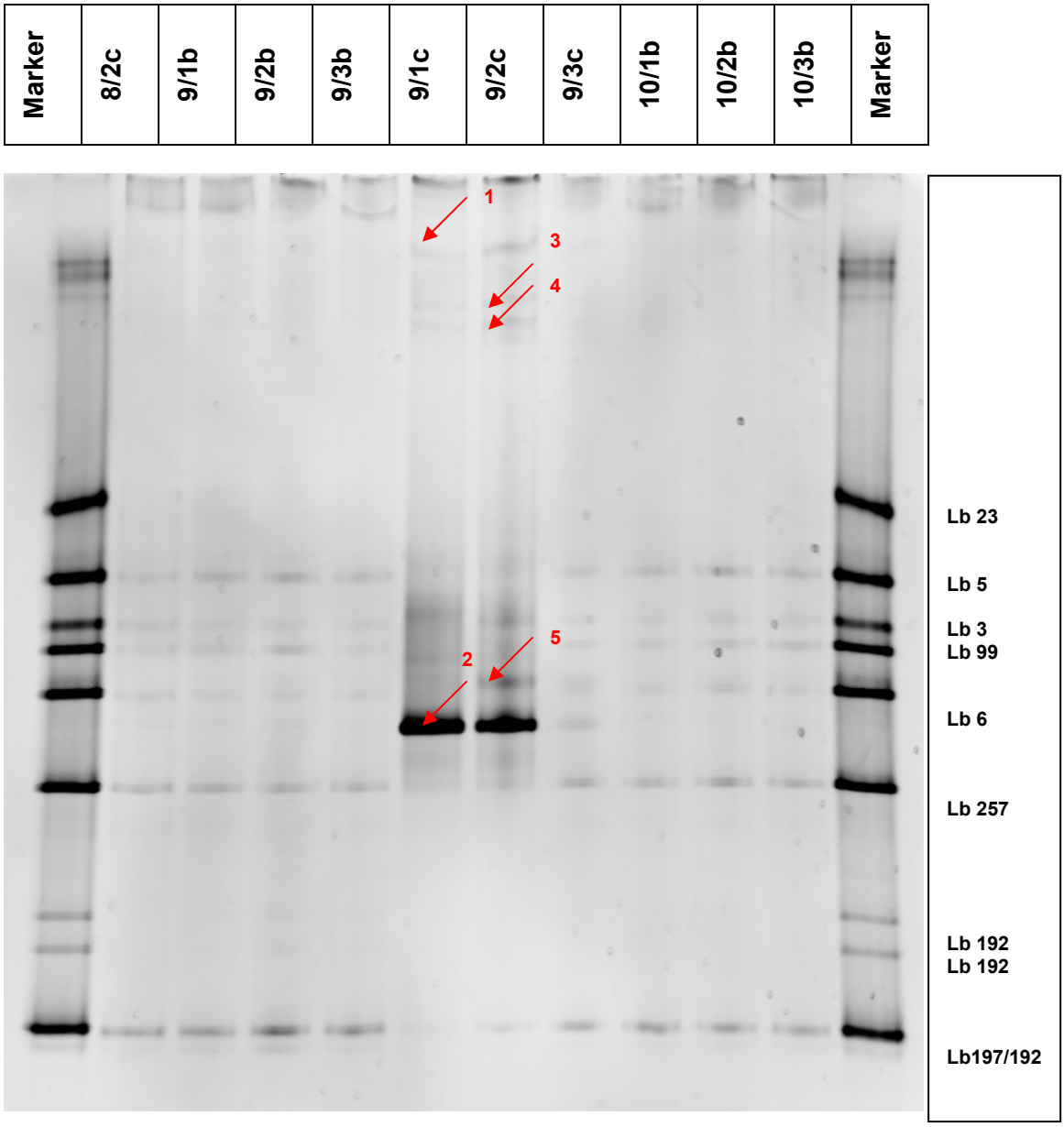

Abb. 9-5: DGGE – Gel 5: 8/2c-10/3b

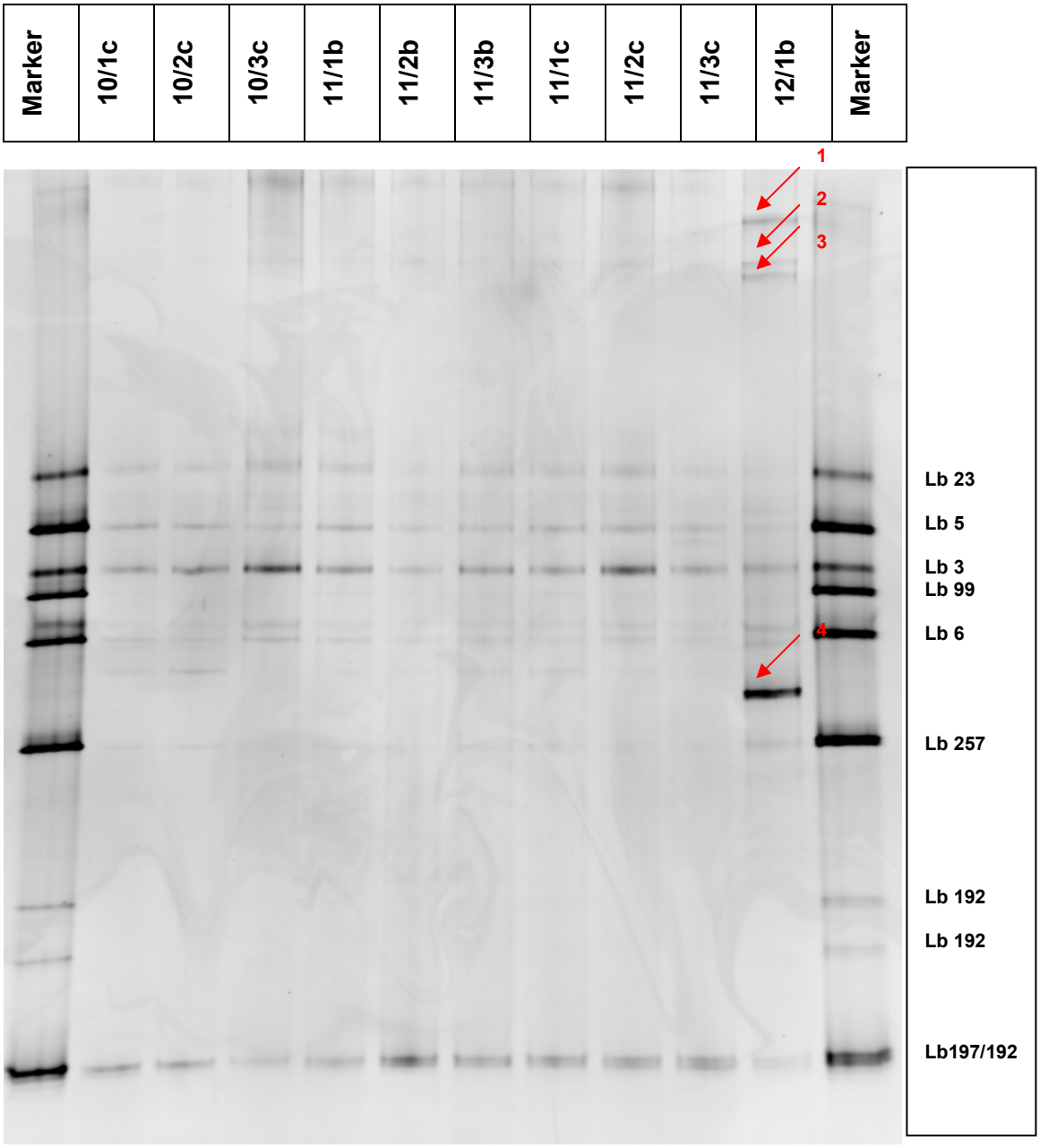

Abb. 9-6: DGGE – Gel 6: Proben 10/1c-12/1b

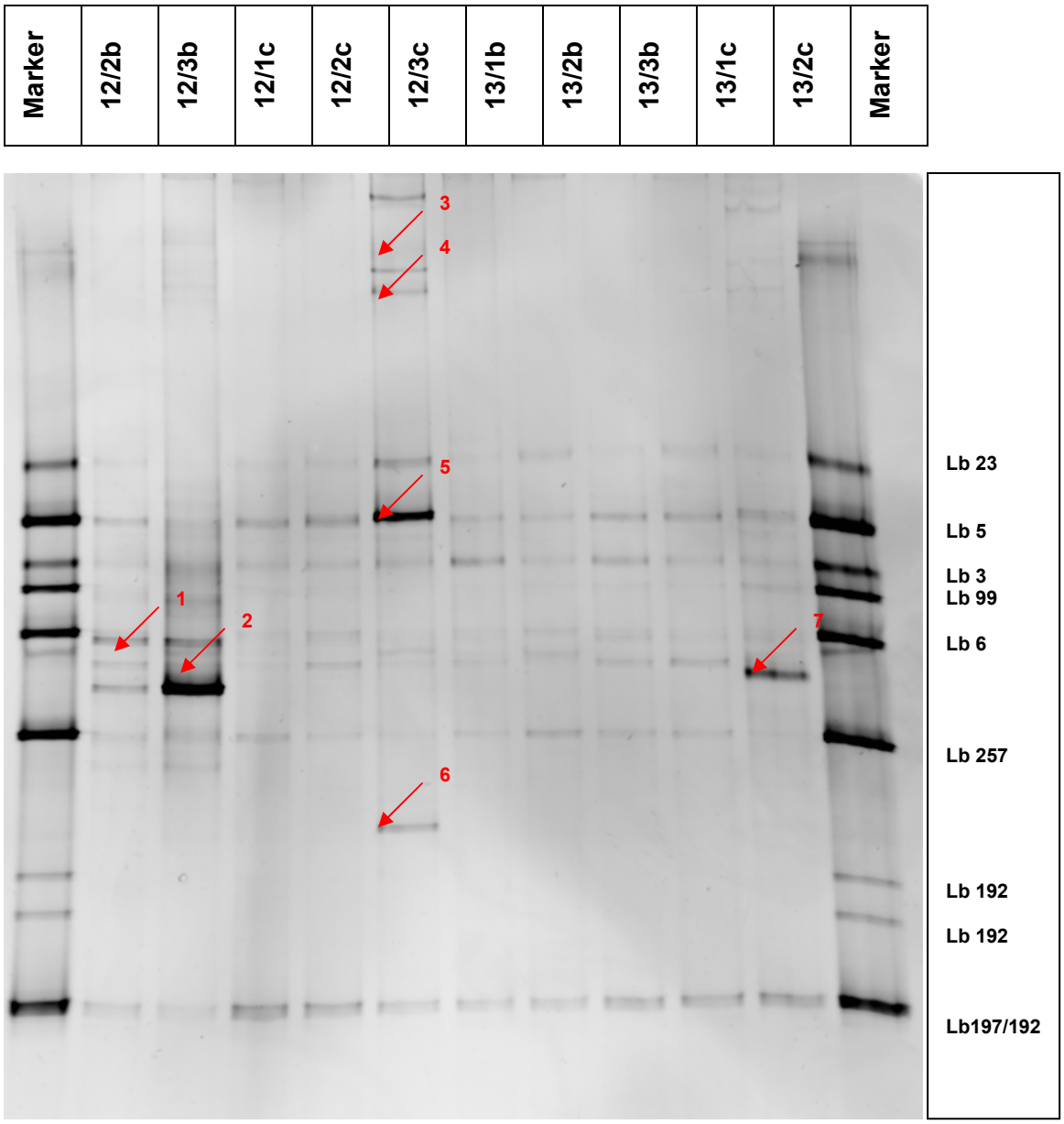

Abb. 9-7: DGGE – Gel 7: Proben 12/2b-13/2c

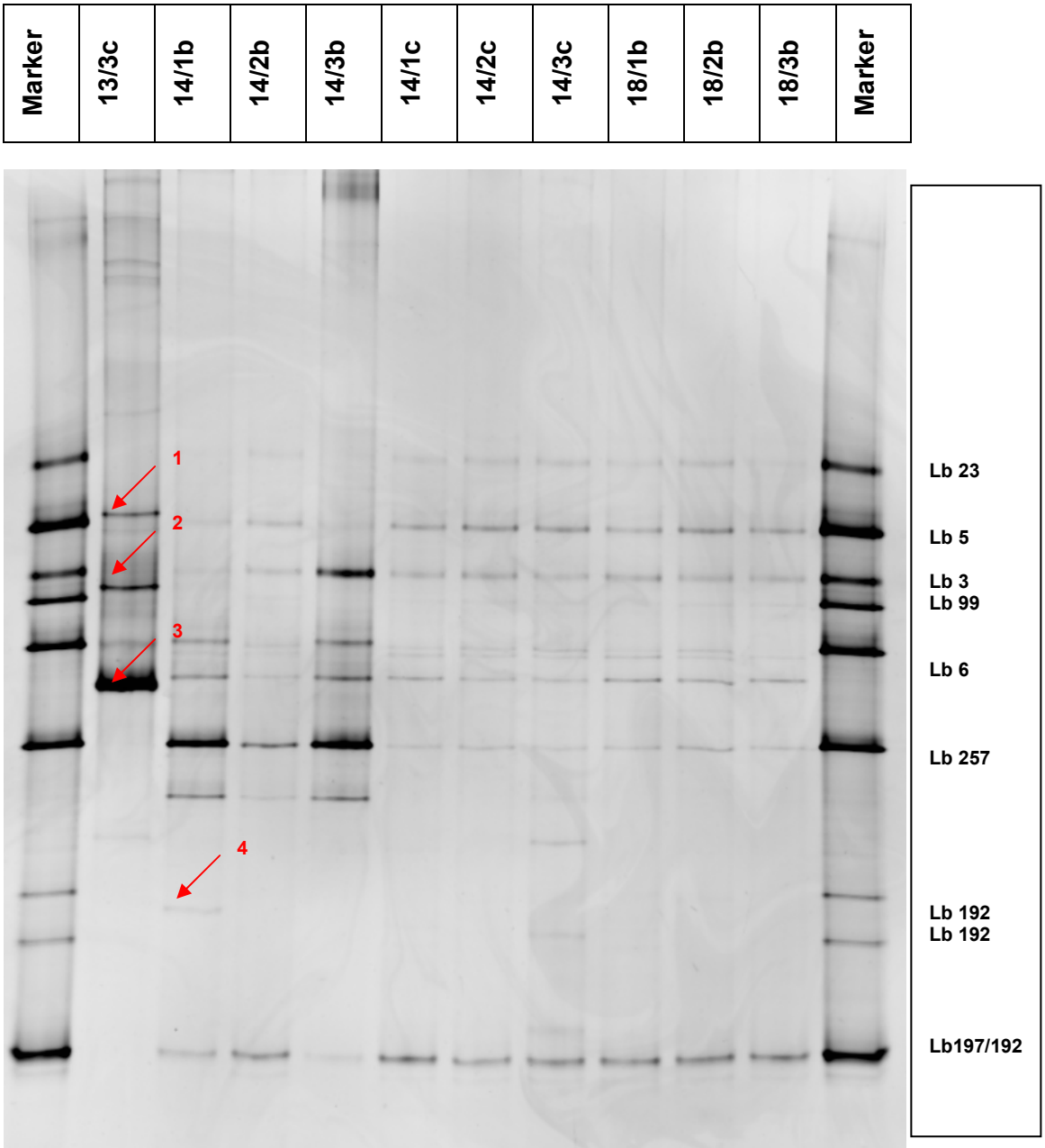

Abb. 9-8: DGGE – Gel 8: Proben 13/3c-183b

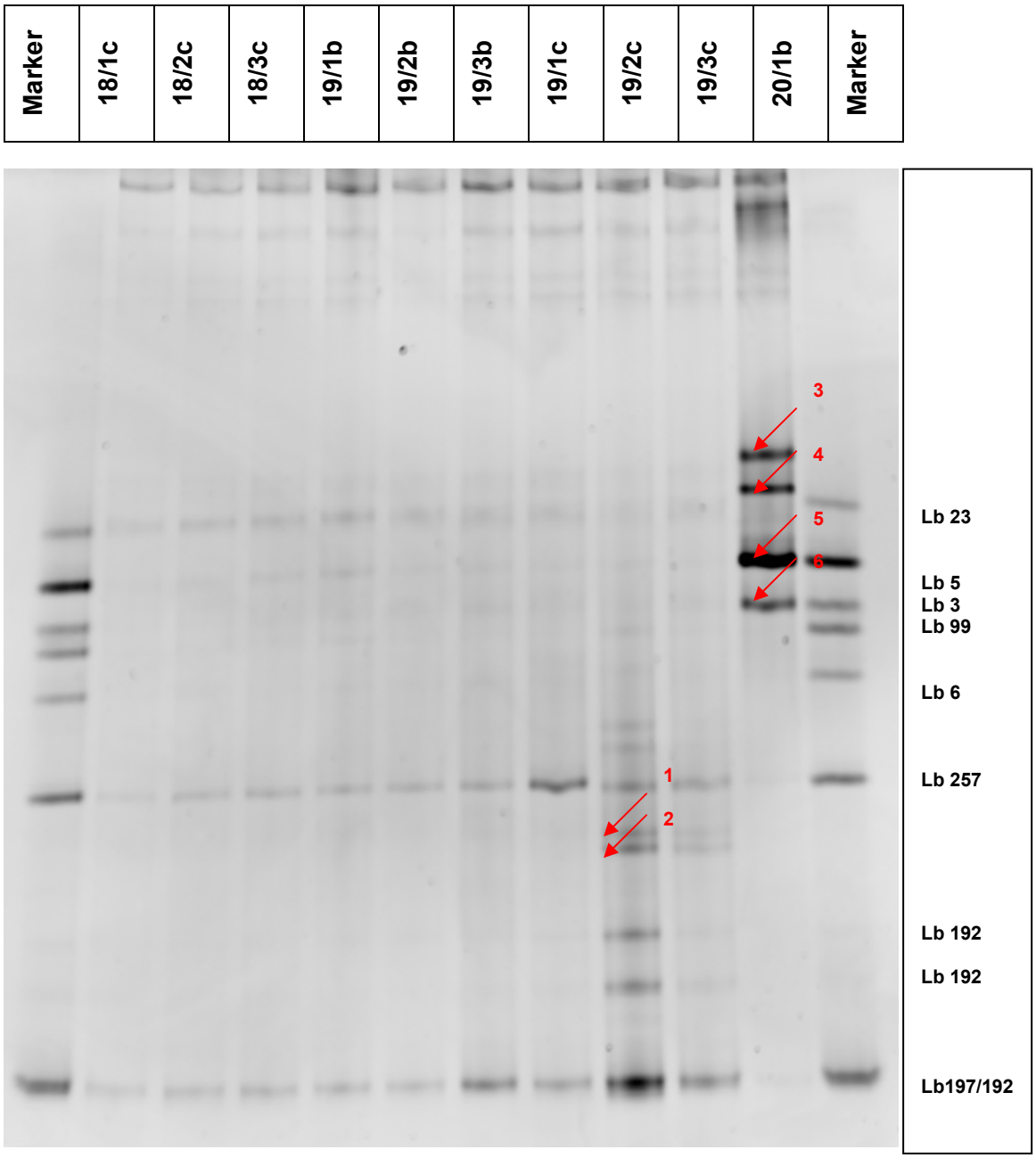

Abb. 9-9: DGGE – Gel 9: Proben 18/1c-20/1b

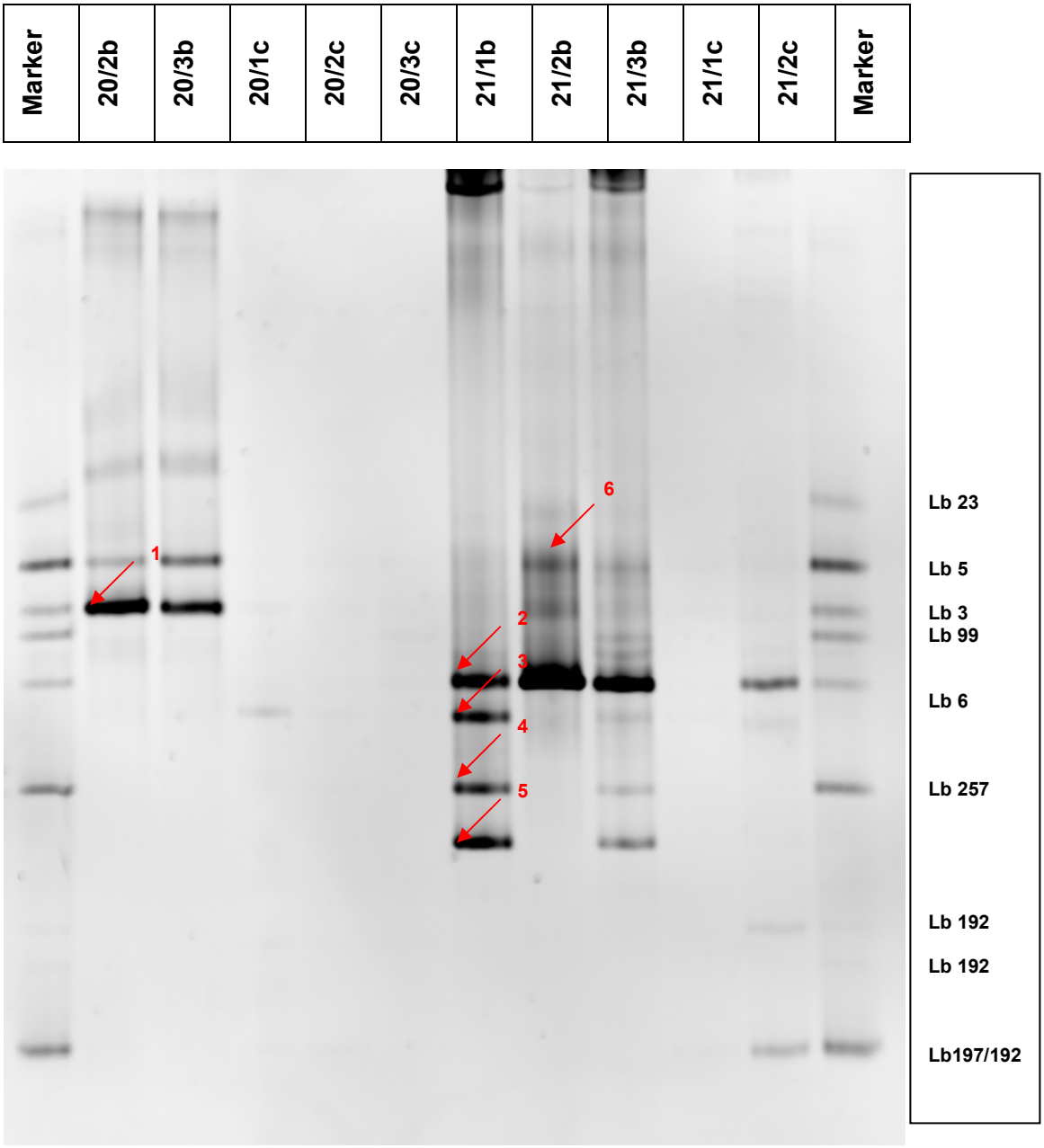

Abb. 9-10: DGGE – Gel 10: Proben 20/2b-21/2c

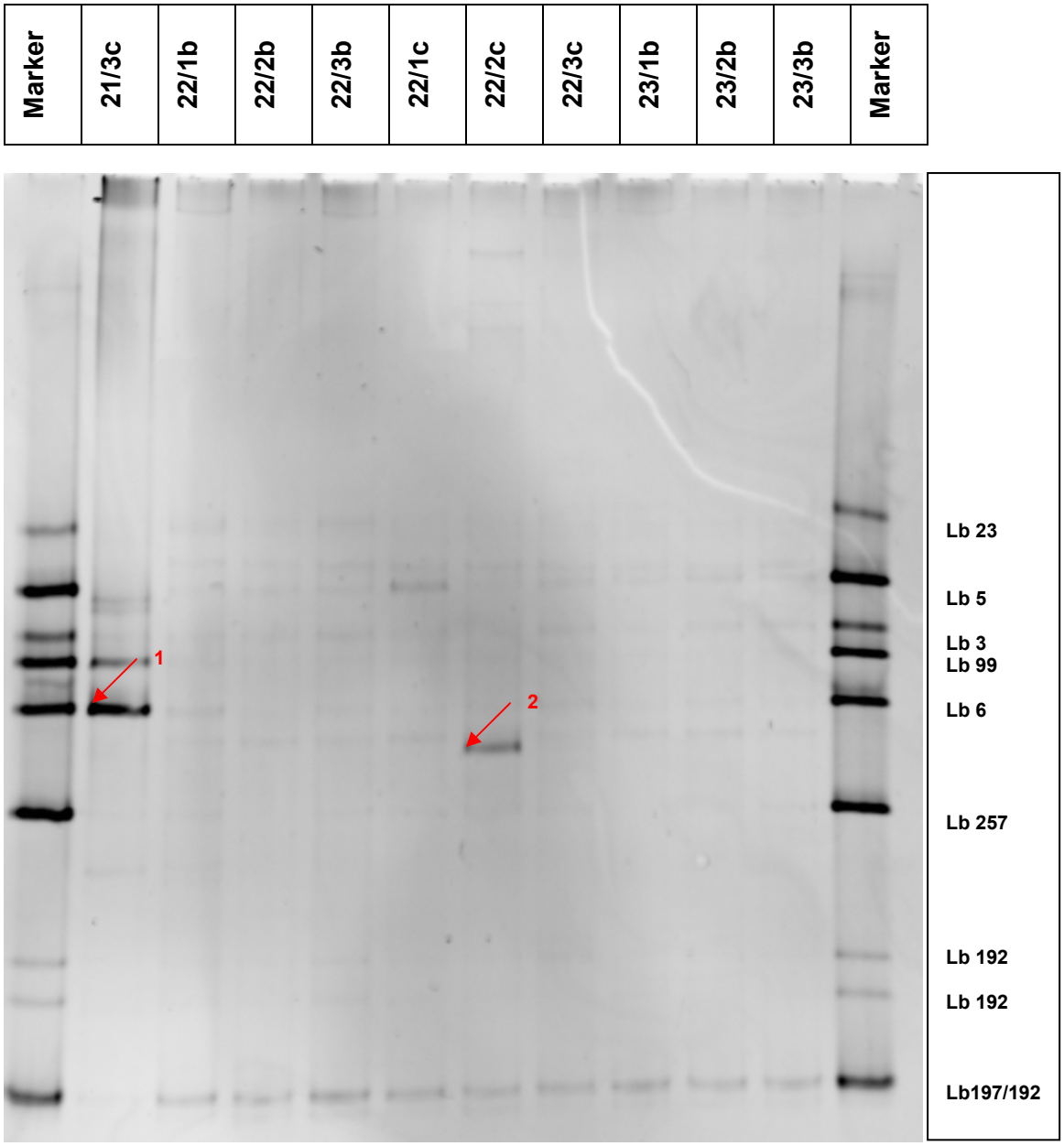

Abb. 9-11: DGGE – Gel 11. Proben 21/3c-23/3b

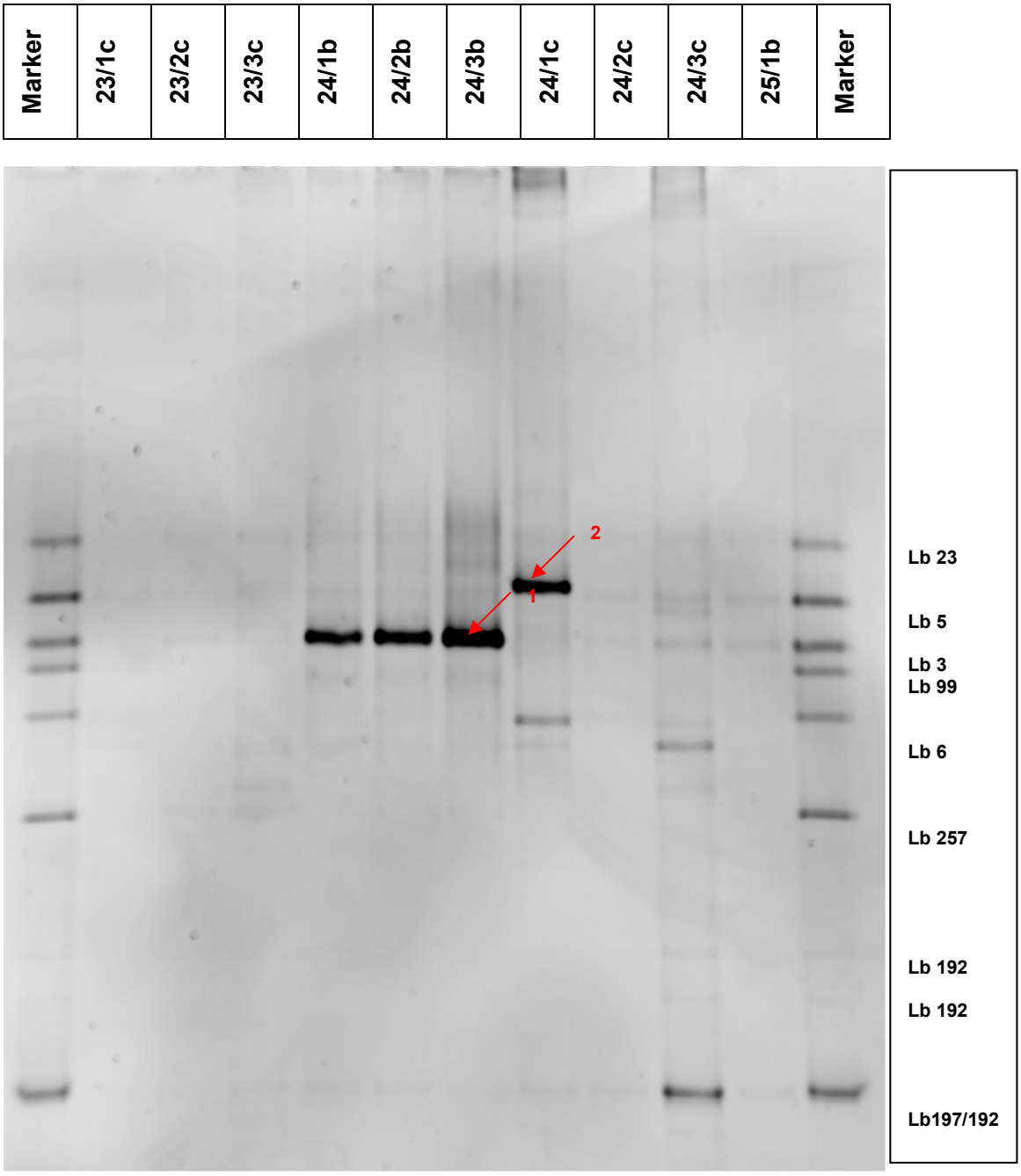

Abb. 9-12: DGGE – Gel 12: Proben 23/1c-25/1b

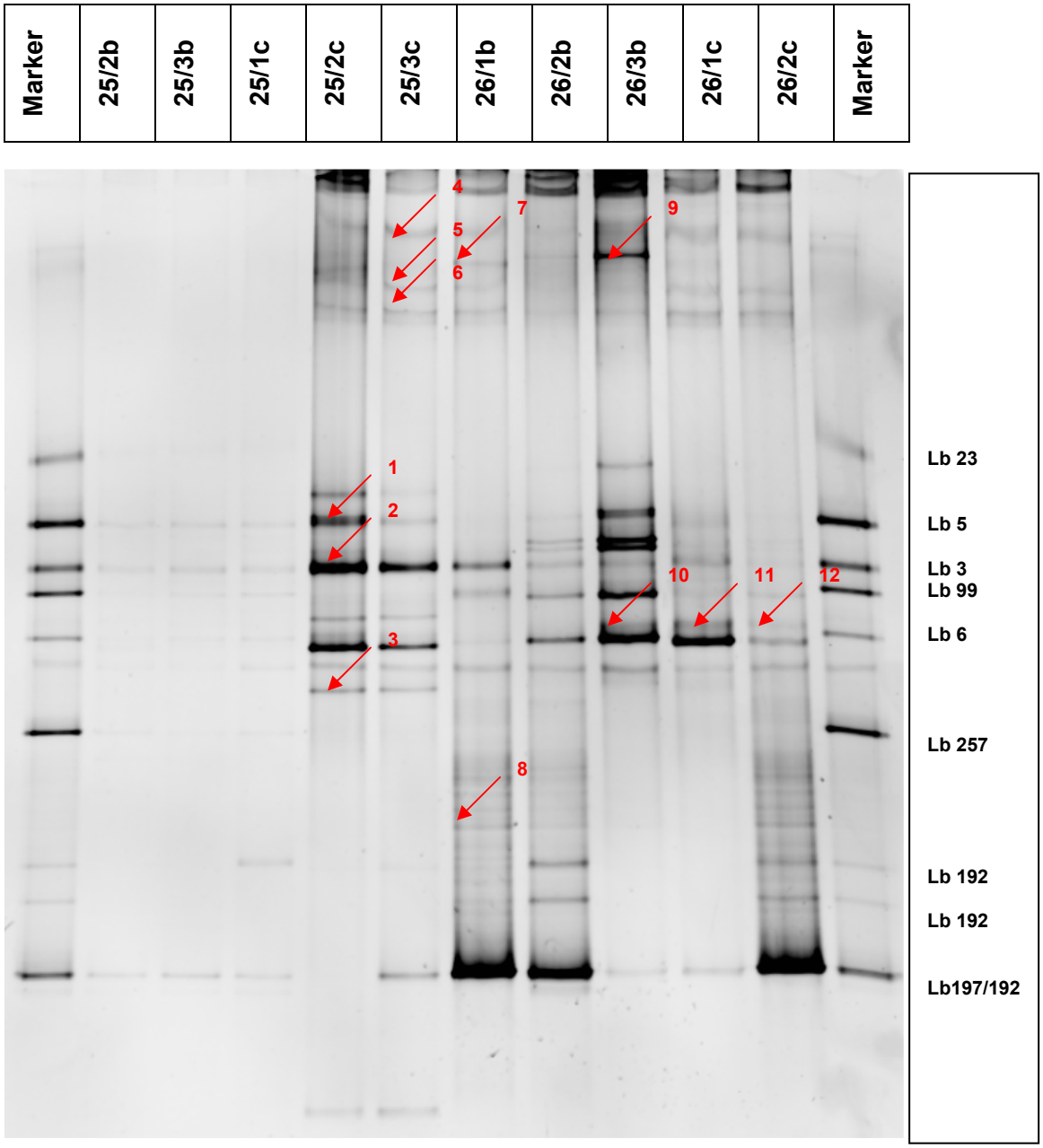

Abb. 9-13: DGGE – Gel 13: Proben 25/2b-26/2c

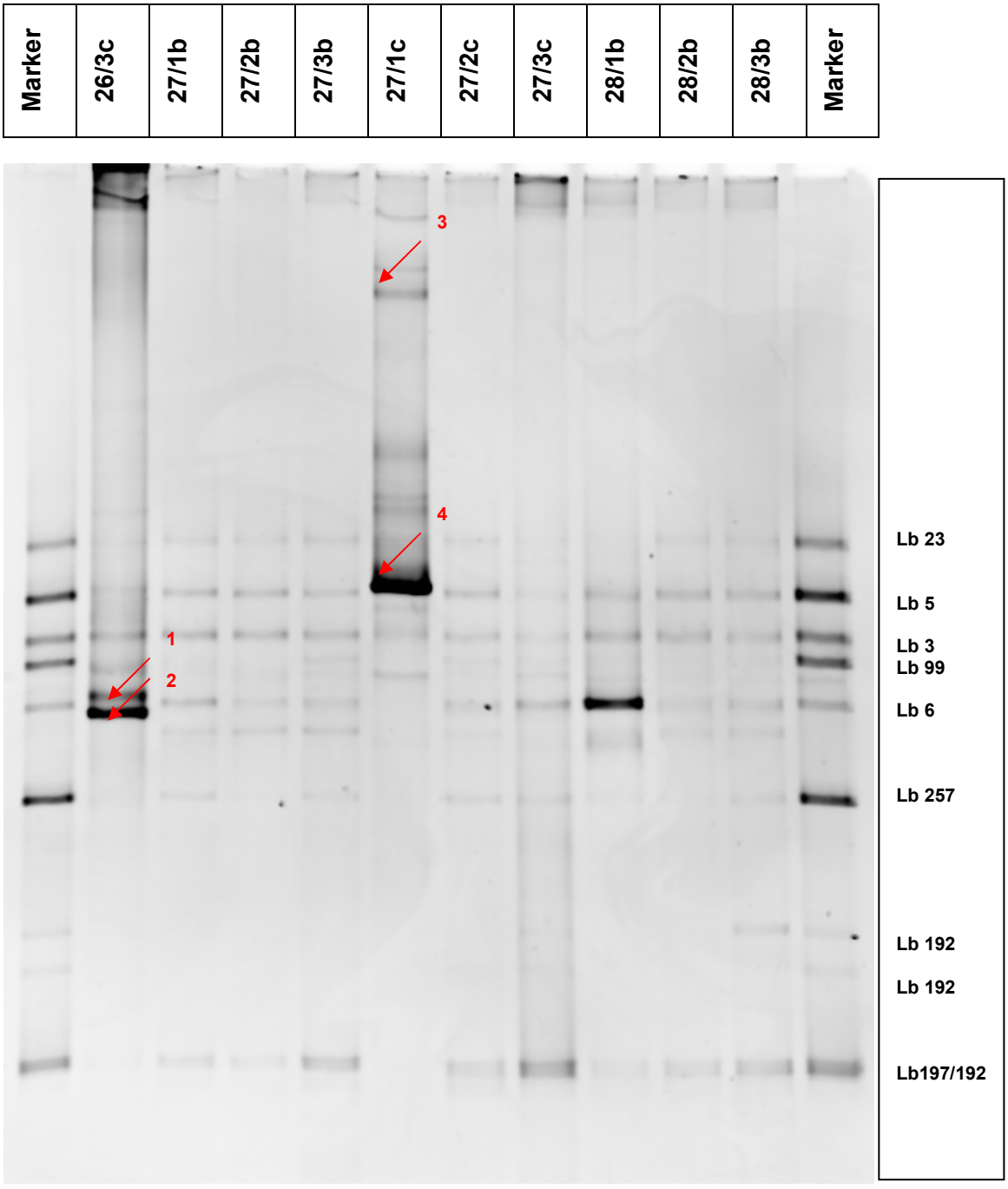

Abb. 9-14: DGGE – Gel 14: Proben 26/3c-28/3b

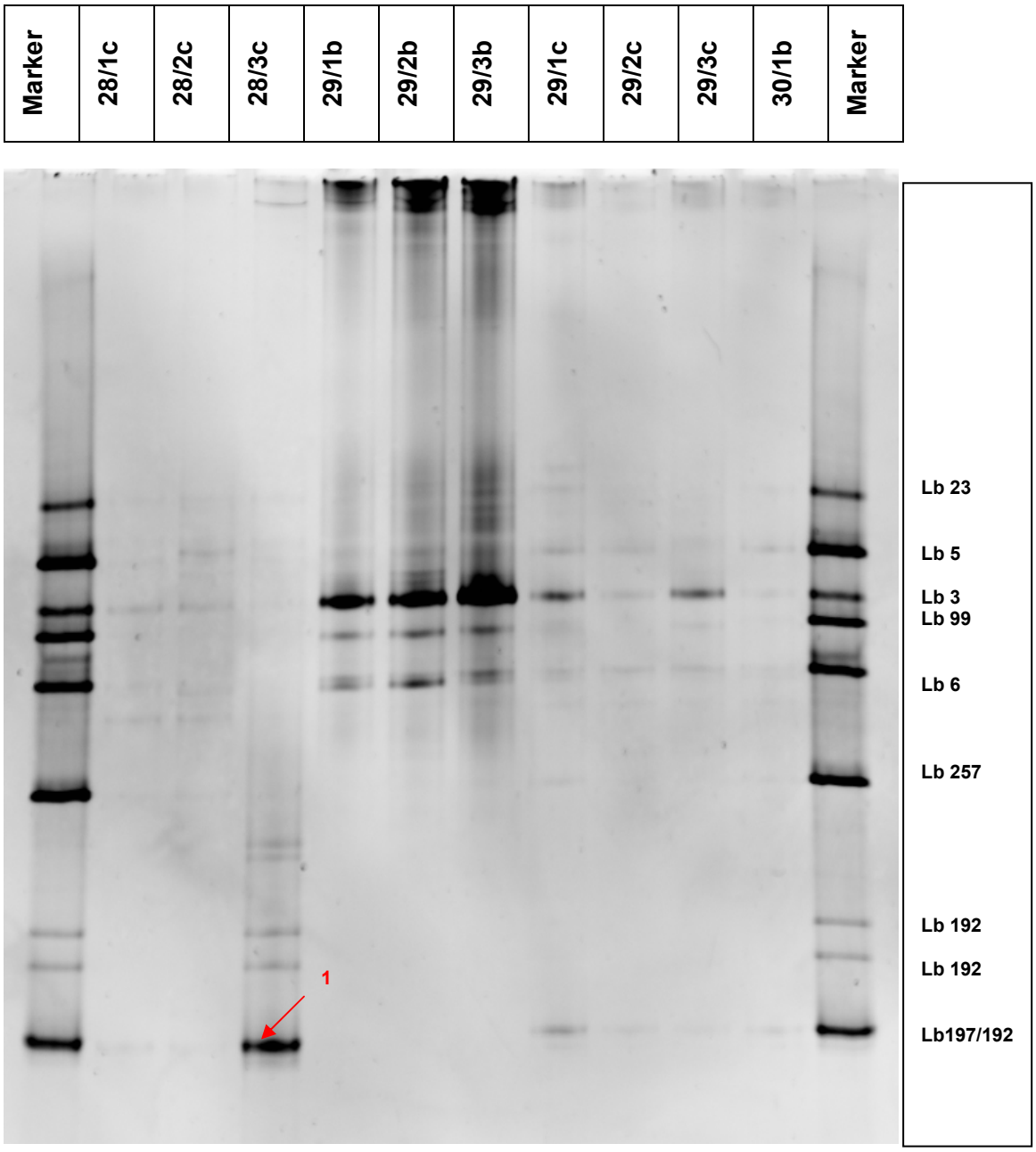

Abb. 9-15: DGGE – Gel 15: Proben 28/1c-30/1b

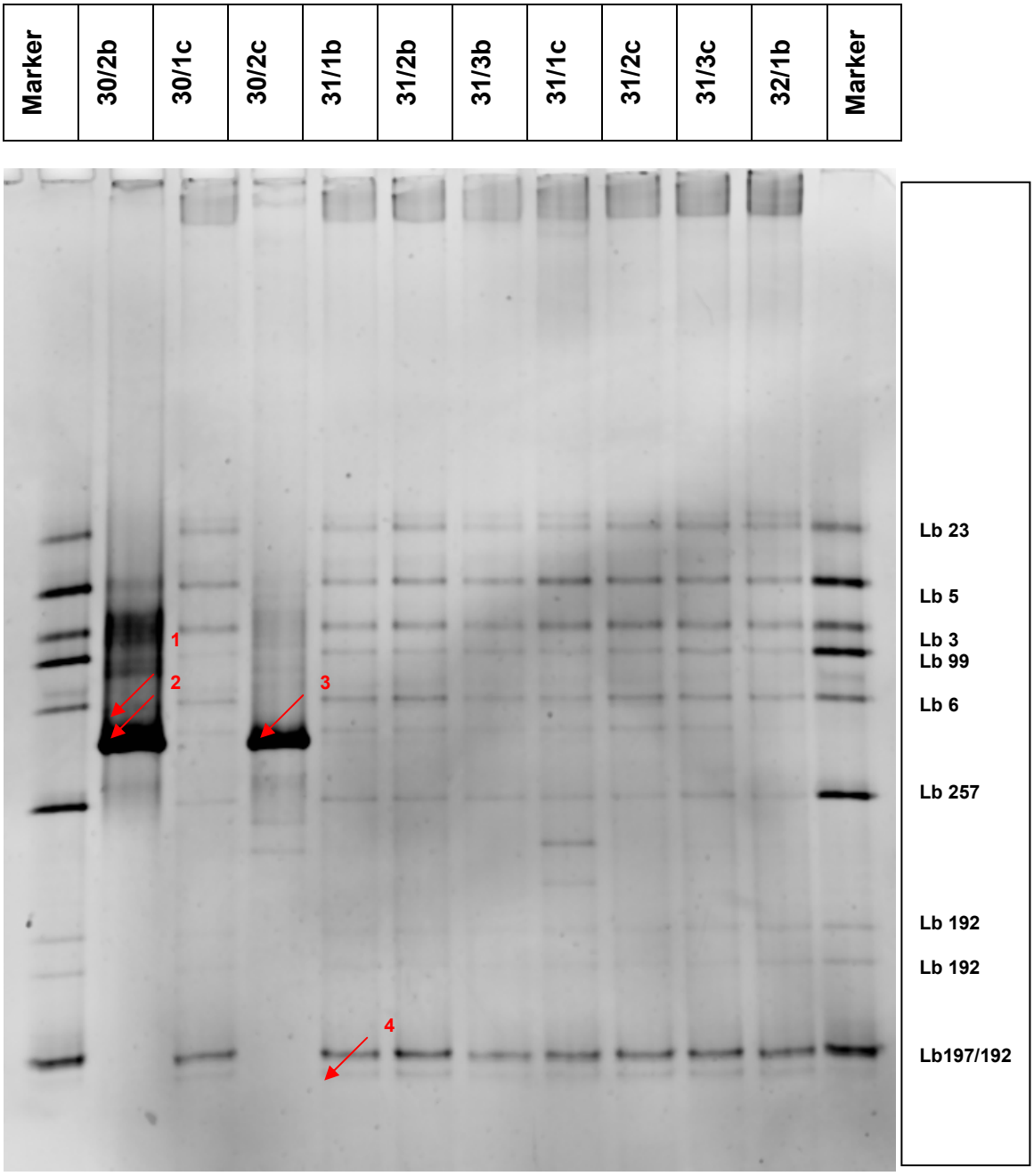

Abb. 9-16: DGGE – Gel 16: Proben 30/2b-32/1b

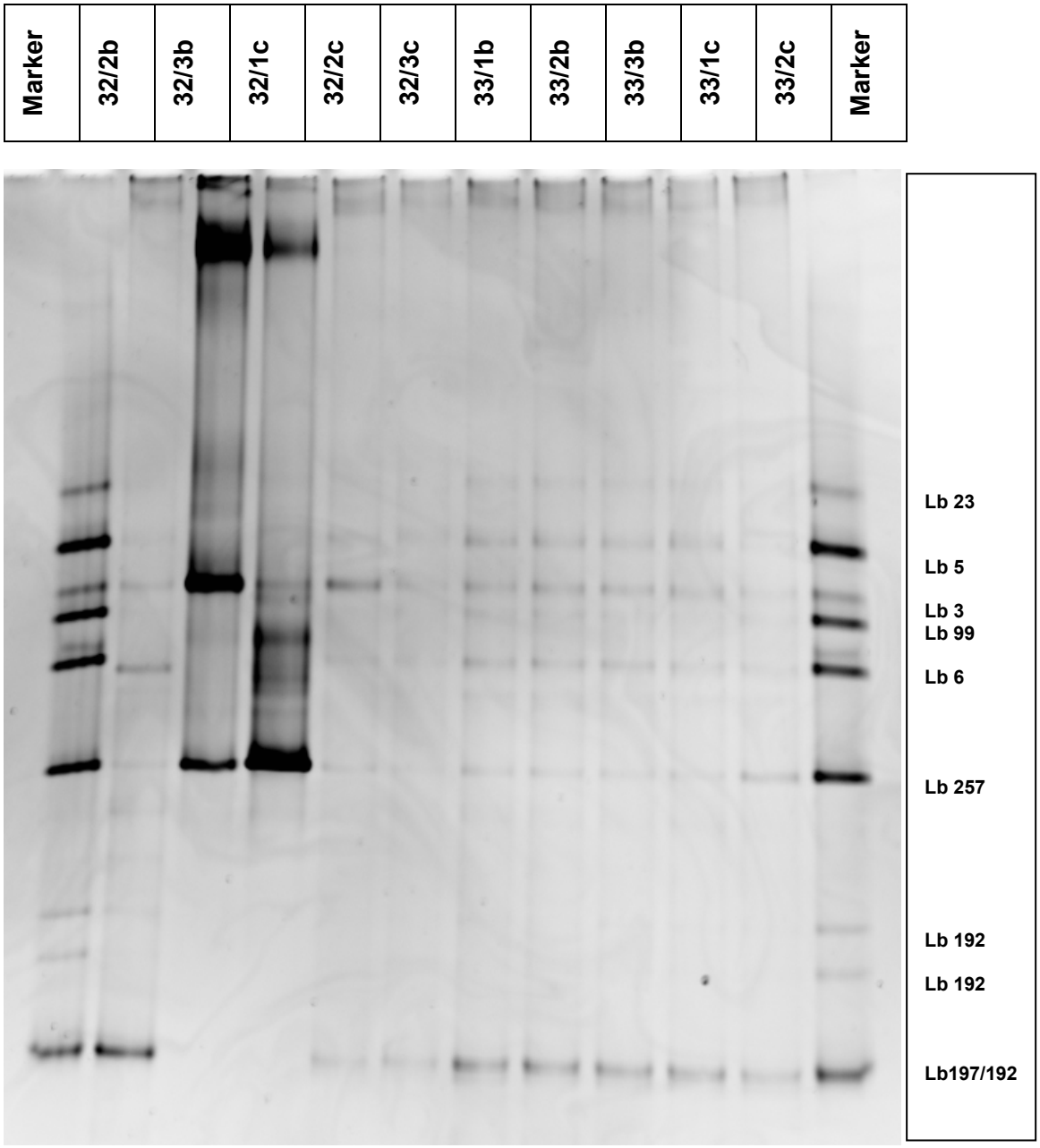

Abb. 9-17: DGGE – Gel 17: Proben 32/2b-33/2c

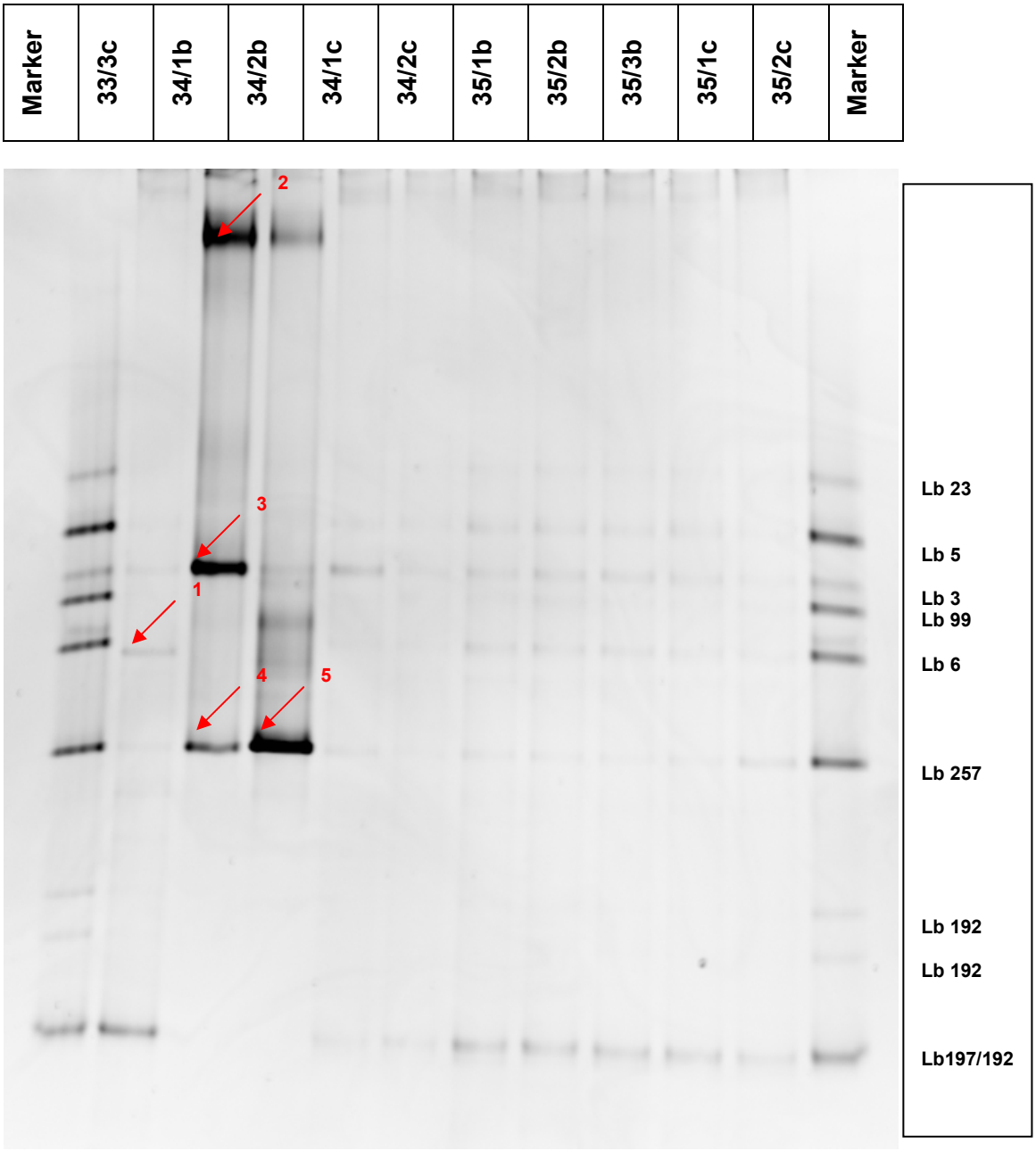

Abb. 9-18: DGGE – Gel 18: Proben 33/3c-35/2c

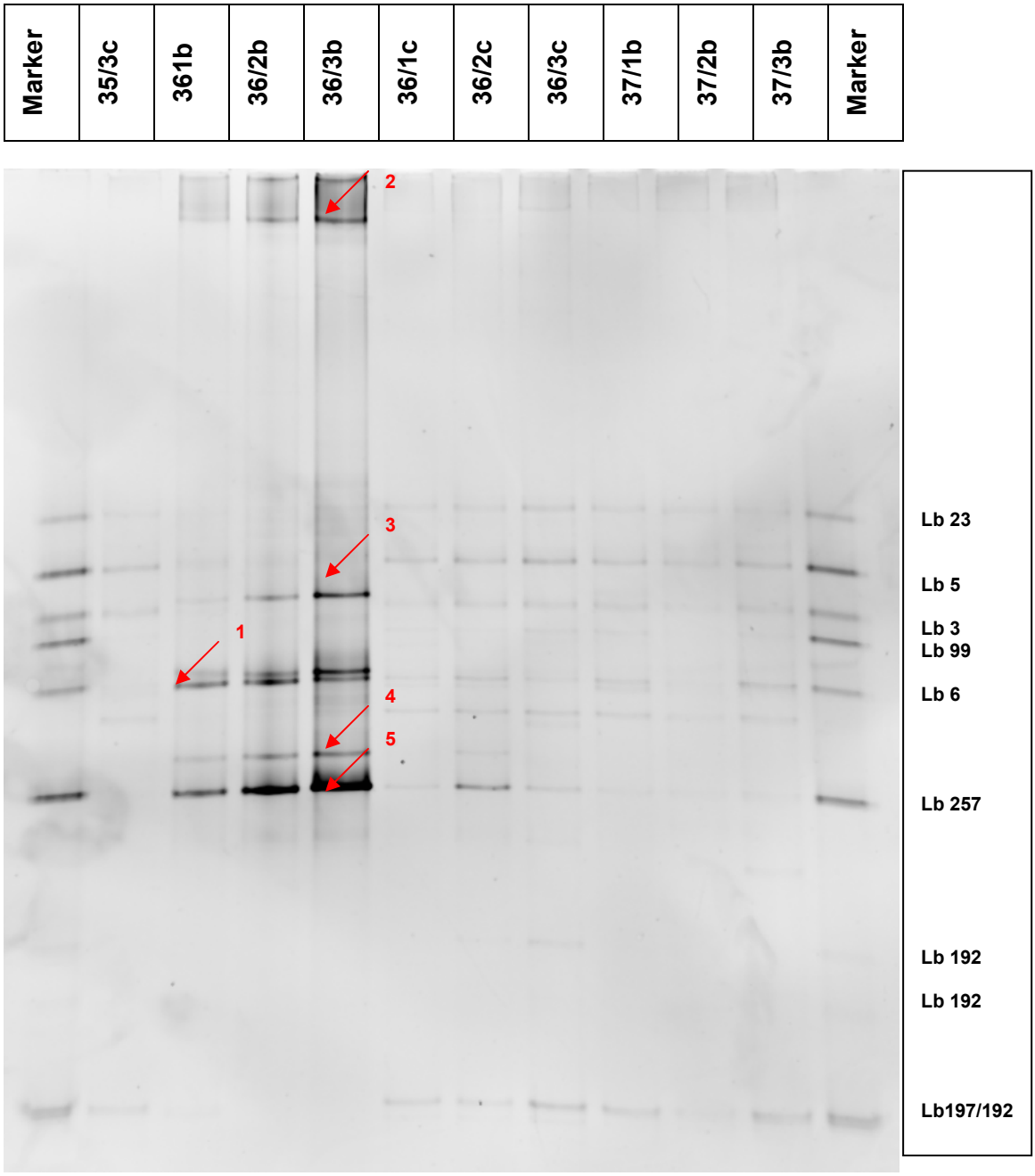

Abb. 9-19: DGGE – Gel 19: Proben 35/3c-37/3

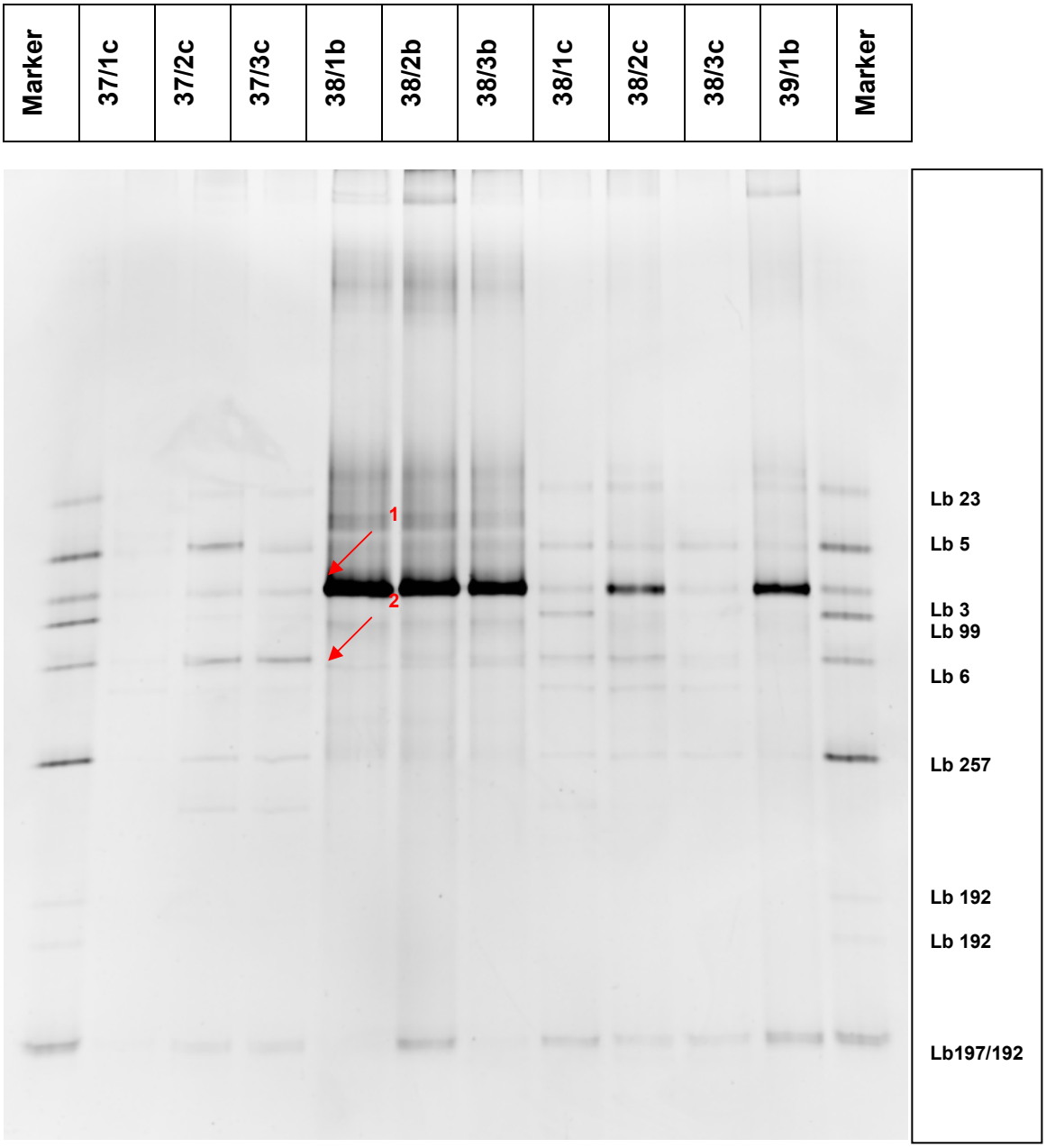

Abb. 9-20: DGGE – Gel 20: Proben 37/1c-39/1b

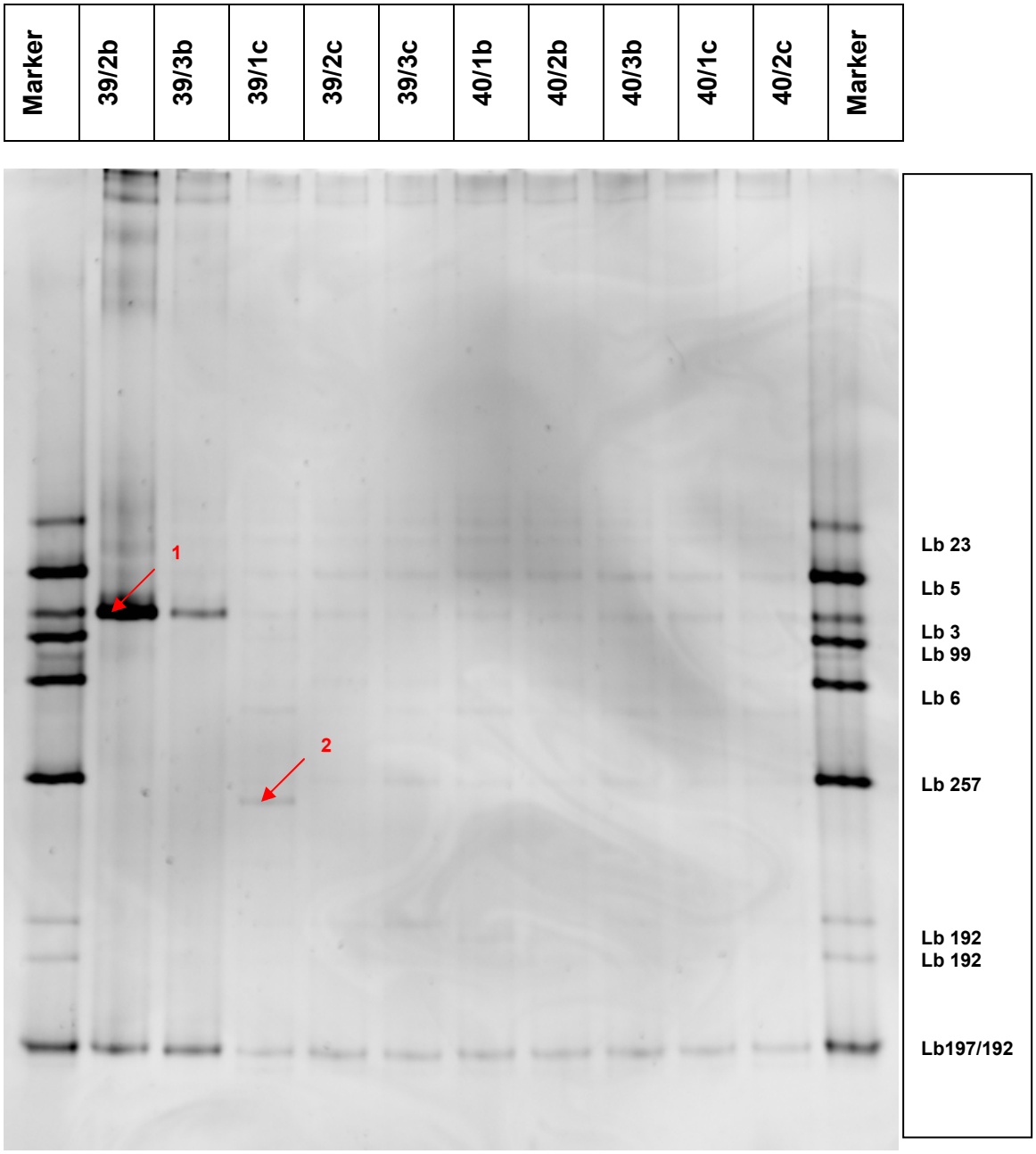

Abb. 9-21: DGGE – Gel 21: Proben 39/2b-40/2c

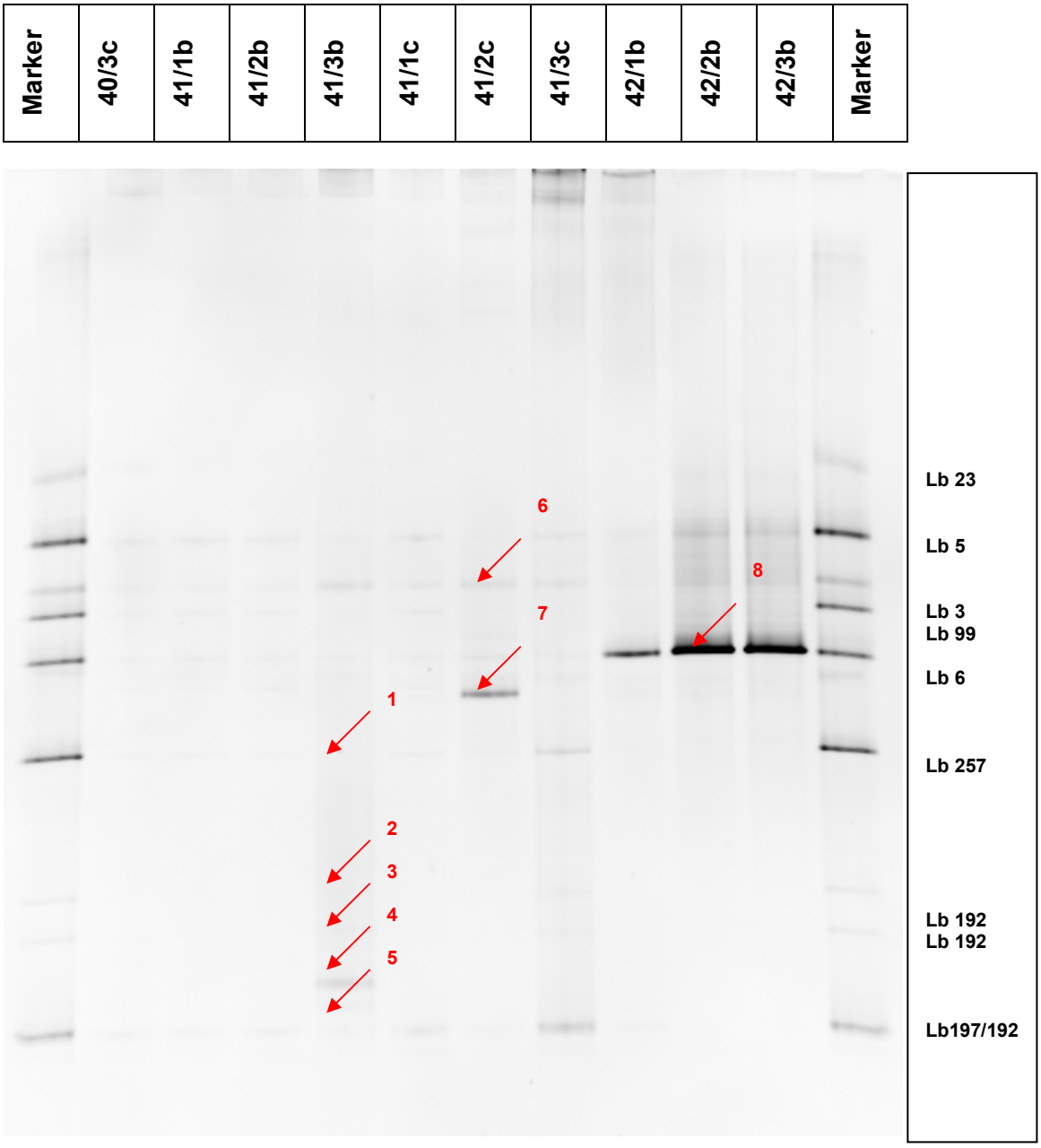

Abb. 9-22: DGGE – Gel 22: Proben 40/3c-42/3b

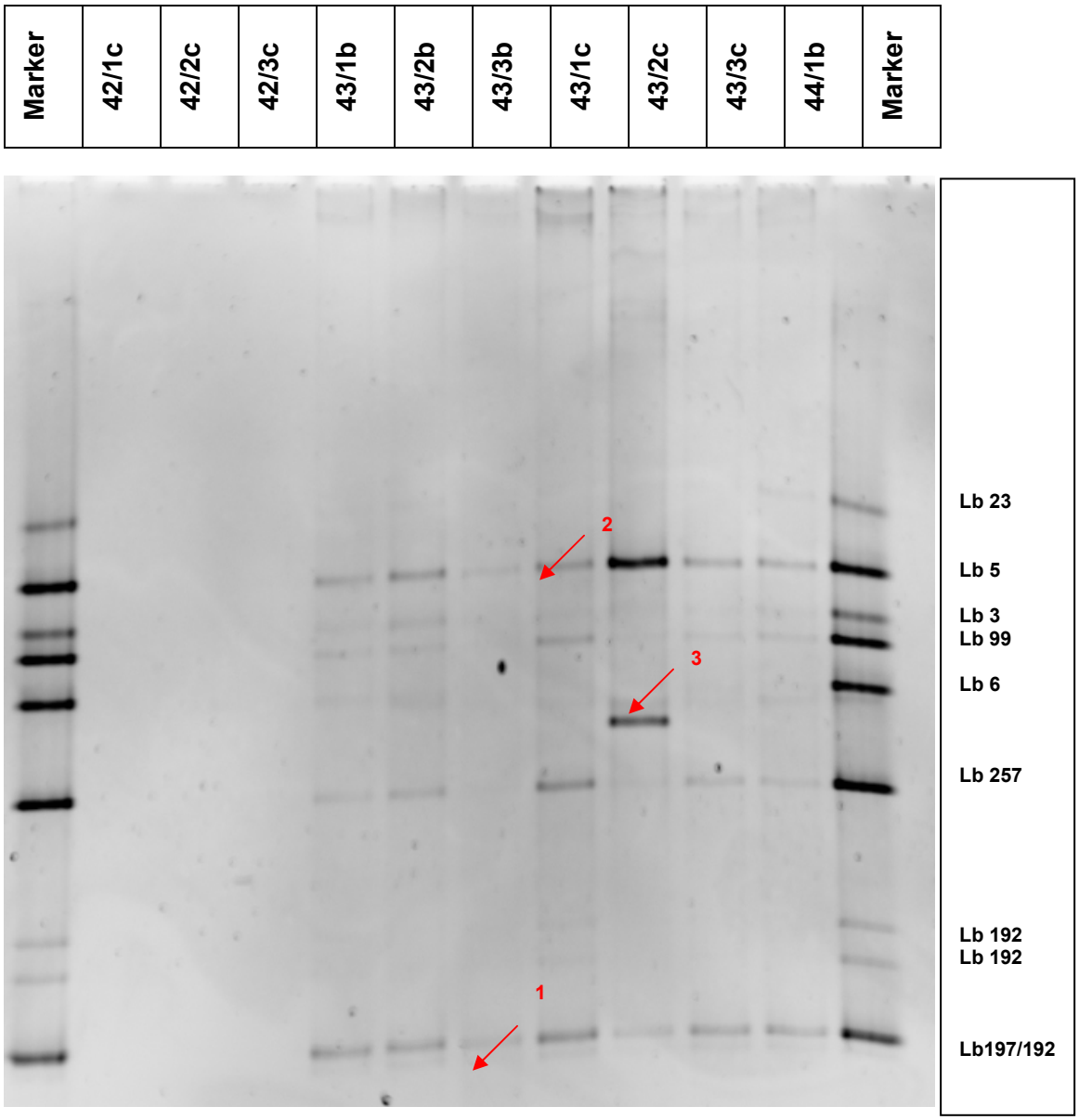

Abb. 9-23: DGGE – Gel 23: Proben 42/1c-44/1b

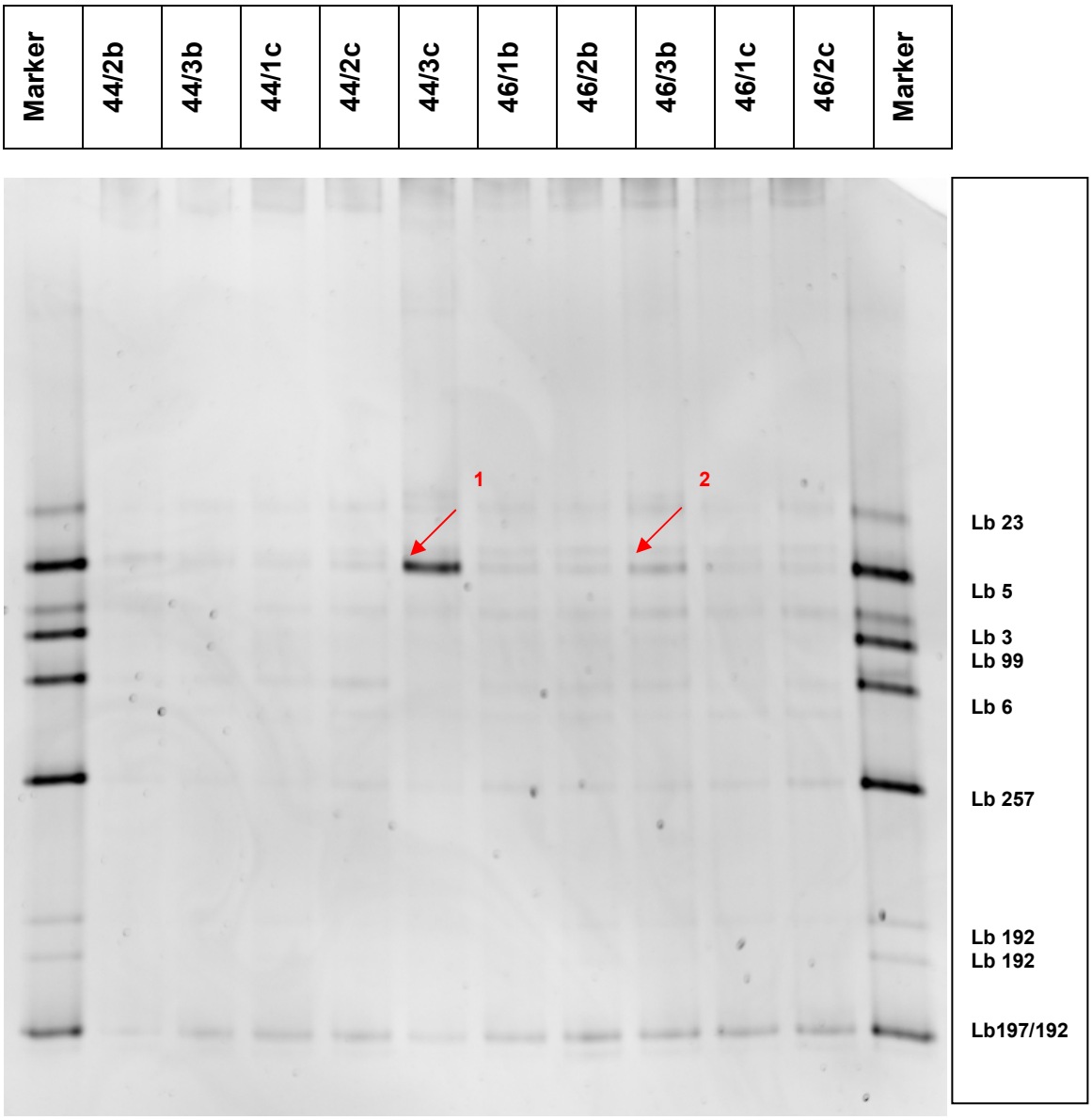

Abb. 9-24: DGGE – Gel 24: Proben 4/2b-46/2c

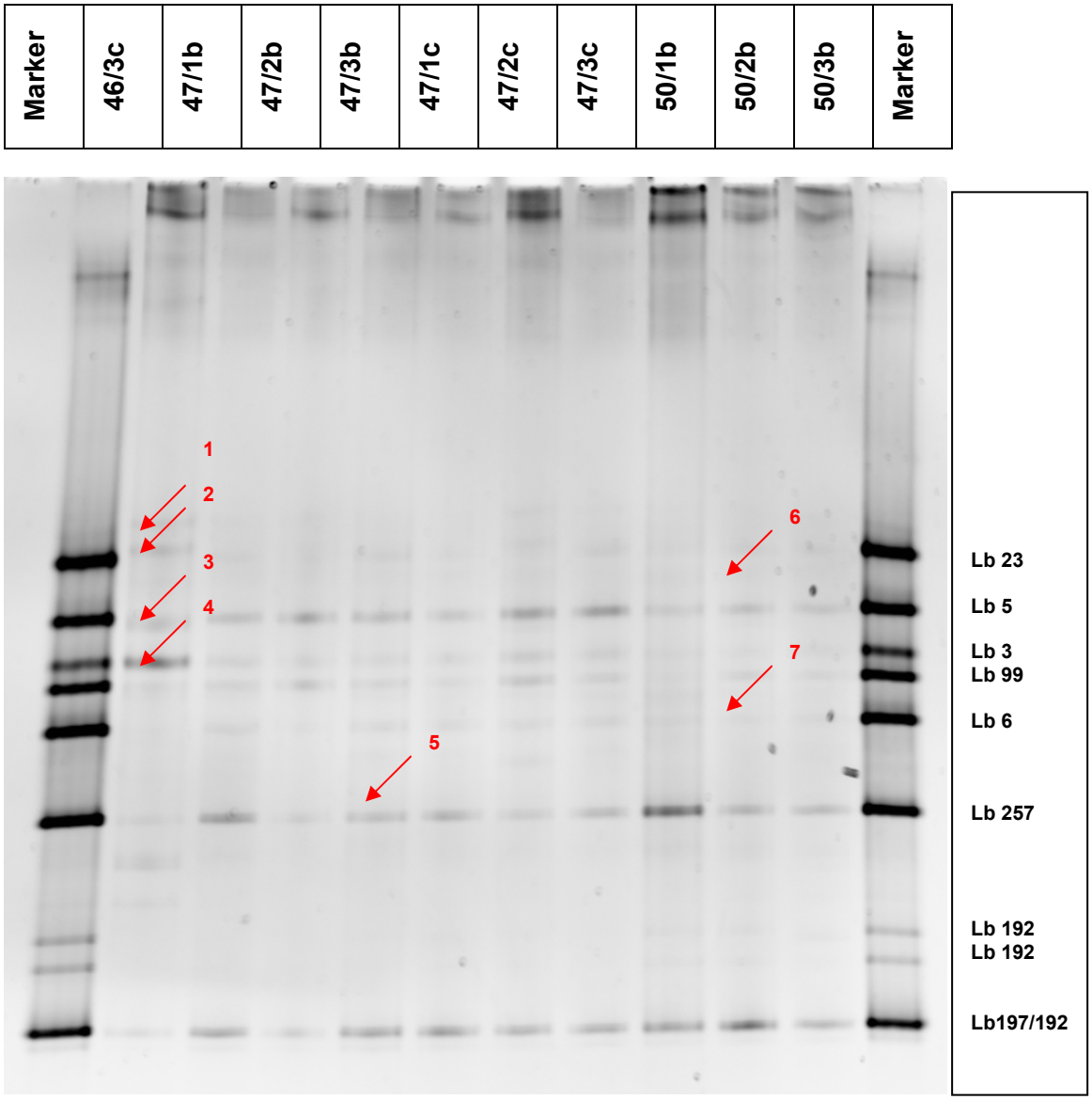

Abb. 9-25: DGGE – Gel 25: Proben 46/3c-50/3b

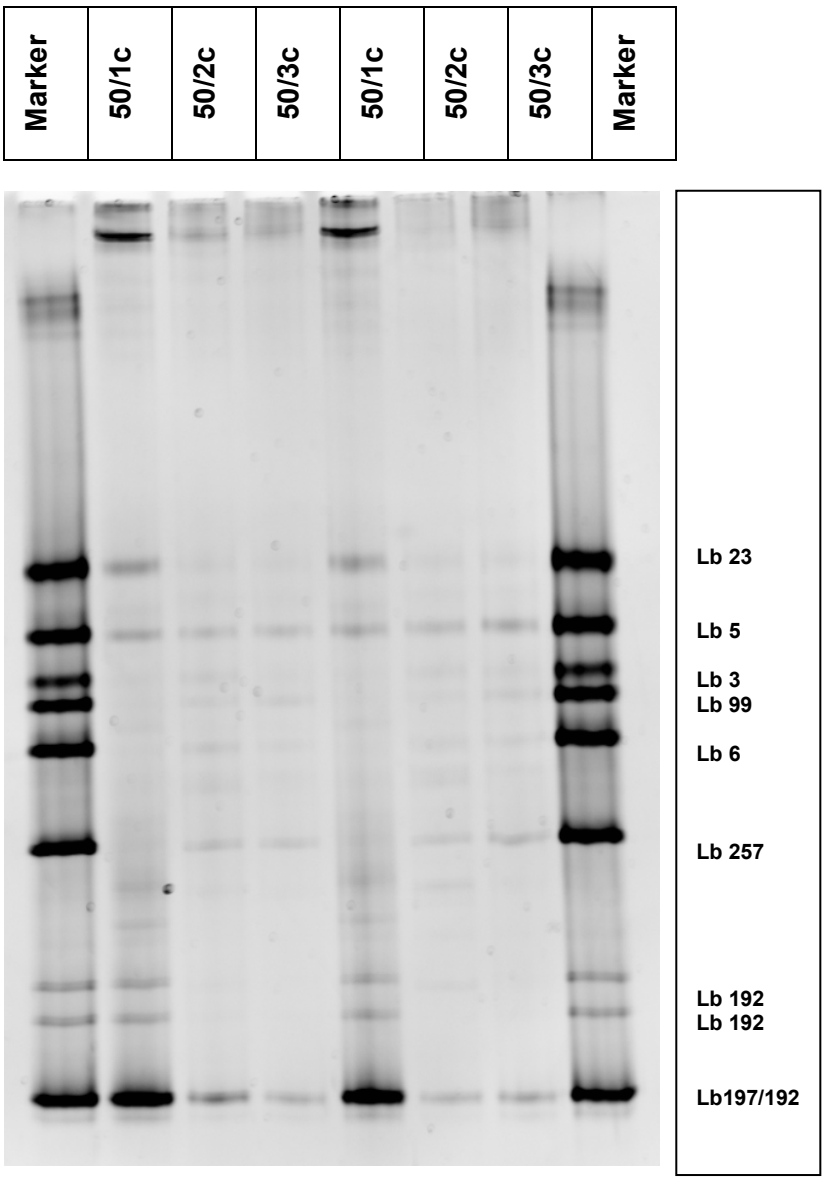

Abb. 9-26: DGGE – Gel 26: Proben 50/1c-50/3c

9.3. Ergebnisse der Sequenzierung im Fasta Format

> I.V.1_Lac1f -- 10..316 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAA
AGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCAA
TGTGTAGCAGTGAAA

> I.V.2_Lac1f -- 9..309 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAA
AGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTAAA
TGTGTACCG

> I.V.3_Lac1f -- 9..312 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCTCGCT

> I.V.4_Lac1f -- 14..314 of sequence
GAGCACACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTA
ACTGTTCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCC
TTCGGCTTAACCGAAGAAGGGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
TAGCGGTGG

> I.V.5_Lac1f -- 12..315 of sequence
GGAGCACACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGT
AACTGTTCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGC
CTTCGGCTTAACCGAAGAAGGGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT
GTAGCAGTGGAA

> I.V.6_Lac1f -- 12..310 of sequence
TGGAGCACACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAG
TAACTGTTCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTTAACCGAAGAAGGGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATG
TGTACCG

> I.V.10_Lac1f -- 25..315 of sequence
TGTGTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGT
TTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACT
CCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCCGGTGAA

> I.V.11_Lac1f -- 12..328 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCAGTGGAATAACGTTCCTC

> I.V.13_Lac1f -- 10..315 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTATTTGATA
GTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCAGTGGAA

> I.V.14_Lac1f -- 11..312 of sequence
GAGCATGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGGAGAAGAACAGGGATGAGAGT
AACTGCTCATCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGT
GTAGCAGT
GG

> I.H.2_Lac1f -- 206..319 of sequence
GGCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGCGGAACTGCATCGGAAACTGGTTAACTTGAG
TGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT

> I.H.4_Lac1f -- 10..316 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTATTTGATA
GTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCAGTGAAAT

> I.H.5_Lac1f -- 30..318 of sequence
TGTGAAGGGTTTCGGACTCGTAAAACTACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGT
GACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTA
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGA
GGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGGTGAA

> I.H.6_Lac1f -- 81..318 of sequence
TCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA
ACTCCATGTGTAGCGGTGA

> I.H.7_Lac1f -- 93..253 of sequence
GATTTTGGTTTGACGGTACCCTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGT
GCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTG
AGCTCAACTCCGGAA

> I.H.8_Lac1f -- 31..316 of sequence
TGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGA
CGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGG
AATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGA

> I.H.9_Lac1f -- 34..318 of sequence
AGCAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGCCGGCGTGACG
GTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAA
GCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGGTGGA

> I.H.10_Lac1f -- 16..319 of sequence
AGACACACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTA
ACTGTTCATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCC
TTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
TAGCAGTGGAAT

> I.H.11_Lac1f -- 34..318 of sequence
GAAGCGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTCACGCAGTGAC
GGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGA
AGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGA

> II.V.1_Lac1f -- 25..315 of sequence
GAGTGTGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCT
TGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
ATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGGTGAAA

> II.V.2_Lac1f -- 94..320 of sequence
CATCGTGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCG
GCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGC
AGTGGAAT

> II.V.3_Lac1f -- 9..310 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATAG
TAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATG
TGTACCAGTG

> IIb.V.1_Lac1f -- 45..320 of sequence
CGGATCCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAAT
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGAAACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGGTGGA

> IIb.V.2_Lac1f -- 92..315 of sequence
GTCGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGC
TCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCAG
TGAAA

> IIb.V.3_Lac1f -- 21..310 of sequence
CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATTTGATAGTAACTGA
TCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
CTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCAATGTGTAC

> II.H.1_Lac1f -- 25..317 of sequence
TGTGTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGT
TTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACT
CCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTAAATGTGTAGCGAGGTGGA
A

> II.H.2_Lac1f -- 24..315 of sequence
TGTGTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAAAGTTAAGGTAGGGAATGACCTTAGC
CTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACT
CCGGAAAGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTGGAAT

> III.V.1_Lac1f -- 33..324 of sequence
AGTGATGAAGGCTTTCAGGCGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAGAATAGGGAATGATTCTAG
TTCGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCG
TTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAAC
TCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTTGAAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTGGAA

> III.V.2_Lac1f -- 25..316 of sequence
TGTGTGTGAAGGCTTTAGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAGAATAGGGAATGATTCTAGT
TCGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACT
CCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTTGTAGAGGTAAGTGGAACTCAATGTGTAGCAGGTGAAA

> III.V.4_Lac1f -- 107..316 of sequence
ACCTTACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGA
TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATG
GCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTTGAAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCAAGTGAA

> III.V.5_Lac1f -- 79..317 of sequence
GAATAGGGAATGATTCTAGTTCGACGGTACCTTACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATG
TGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTTGAAGAGGTAAGTGGAAC
TCCATGTGTAGCAGTGAAAT

> III.V.6_Lac1f -- 126..208 of sequence
GGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG
AGCGCAGGCG

> III.H.2_Lac1f -- 98..264 of sequence
CTCTTCTGTTGACGGTAACTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCGGTTGGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCG
GCTTAACCGTGGAAGGGCATC

> III.H.3_Lac1f -- 100..267 of sequence
CTTTACTGTTGACGGTAACTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCGGTTGGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCG
GCTTAACCGTGGAAGGGCATCG

> III.H.4_Lac1f -- 96..260 of sequence
CTTTTCTGTTGACGGTAACTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCGGTTGGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCG
GCTTAACCGTGGAAGGGCA

> III.H.5_Lac1f -- 28..310 of sequence
ATGTGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGCGATGAAAAAGGTCAAGAGTAACTGCTTGACTGTTG
ACAGTAGCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGACAAGCGTTGT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCGGTTGGTTCAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTTAACCGTG
GAAGGTCATTGGAAACTGACTAACTTGAATGCAGAAGAGGAAAGCGGAATTCCATGTGTAGCAG

> IV.V.1_Lac1f -- 10..315 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAG
TAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
TGTAGCGGTGGAAT

> IV.V.3_Lac1f -- 28..313 of sequence
TGTGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGCGATGAAAAAGGTCAAGAGTAACTGCTTGACTGTTGA
CAGTAGCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGACAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCGGTTGGTTCAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTTAACCGTGG
AAGGTCATTGGAAACTGACTAACTTGAATGCAGAAGAGGAAAGCGGAATTCCATGTGTAGCACCCTT

> IV.V.4_Lac1f -- 15..317 of sequence
AGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATAGTA
ACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
TTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCAATGTG
TAGCCAGGTGG

> IV.V.5_Lac1f -- 42..315 of sequence
GGATTGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG
CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAA
ACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGGTGGA

> IV.V.6_Lac1f -- 9..308 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGAT
AGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCAA
TGTGTACC

> IV.V.7_Lac1f -- 30..314 of sequence
TGTGAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAAAGTTAAGGTAGGGAATGACCTTAGCCTGAC
GGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGGTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGA
AAGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTTTAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTTTT

> IV.V.8_Lac1f -- 29..317 of sequence
GTGTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTT
TGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTT
ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTC
CGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAA

> IV.H.1_Lac1f -- 11..251 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATA
GTAACTGATCTTGTATTGACGGTATCCAACCAGAAAGGCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTATGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCAGCTCAACCCAAGAA
G

> IV.H.2_Lac1f -- 161..205 of sequence
AGCGTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCA

> IV.H.3_Lac1f -- 10..307 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGCGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAA
TAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCA
ATGTGT

> IV.H.6_Lac1f -- 89..278 of sequence
CCTTGGCAATTGACGTTACCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG
TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGATTGAGTCAGATGTGAAATCCCCG
GGCTTAACCCGGGAATTGCATCTGATACTGGTCAGCTAGAGTCT

> V.V.4_Lac1f -- 78..317 of sequence
GGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAA
CTCAATGTGTAGCAGTGGAAT

> V.V.5_Lac1f -- 11..316 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAG
TAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATG
TGTAGCAGTGAAAT

> V.V.10_Lac1f -- 10..316 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGAAAT

> V.V.11_Lac1f -- 8..315 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAA
AGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCA
TGTGTAGCAGTGAAAT

> V.V.12_Lac1f -- 12..311 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCA

> V.V.13_Lac1f -- 8..309 of sequence
TGATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGG
TAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGA
AAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCC
ATGTGTAGCA

> V.H.2_Lac1f -- 7..310 of sequence
TGATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGG
TAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGA
AAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACAAA
ATGTGTAGCCAG

> V.H.4_Lac1f -- 9..312 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACAGGGGT
AGTAACTGGCCTTTGTTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGAA
AGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCTAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCA
TGTGTACCAGTG

> V.H.5_Lac1f -- 11..319 of sequence
TGGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACGGGGGTA
GTAACTGACCTTTGTTTGACGGTAATCAATTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCGAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGGAATAA

> V.H.6_Lac1f -- 9..313 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACAGGGGTAG
TAACTGACCTTTGTTTGACGGTAATCAATTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCGAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTCAATG
TGTAGCAGTGGAA

> V.H.7_Lac1f -- 11..320 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACGGGGGTA
GTAACTGACCTTTGTTTGACGGTAATCAATTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCGAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATAAA

> V.H.8_Lac1f -- 8..311 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAA
AGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCA
TGTGTACCGGTG

> VI.V.1_Lac1f -- 9..311 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAA
AGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCAA
TGTGTAGCGGG

> VI.V.2_Lac1f -- 27..317 of sequence
GTGTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTT
TGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTT
ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTC
CGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGGTGAAA

> VI.H.3_Lac1f -- 10..310 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCAAT
GTGTAGCC
A

> VI.H.4_Lac1f -- 11..314 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATAG
TAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATG
TGTAGCAGTGAA

> VII.V.1_Lac1f -- 10..314 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAG
TAACTGTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
TGTAGCGGGTGAA

> VII.V.2_Lac1f -- 13..320 of sequence
TGGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGA
GTAACTGTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATA

> VII.V.3_Lac1f -- 10..314 of sequence
TGGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAGGTCTTCGGATCGTAAAACCCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAG
TAACTGTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
TGTAGCAGTGGAA

> VII.V.5_Lac1f -- 203..314 of sequence
AGGGAGTGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGG
TAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTG

> VII.V.6_Lac1f -- 195..330 of sequence
AAGGGAGTGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAATTGCATCGGAAACTG
GTAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTGAAATAATCGCCATCC

> VII.V.7_Lac1f -- 194..318 of sequence
AAGGGAGTGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAATTGCATCGGAAACTG
GTAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTGAAAT

> VII.V.8_Lac1f -- 15..317 of sequence
ACACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAAC
TGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTT
CGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTA
GCAGTGAAATA

> VII.V.9_Lac1f -- 14..330 of sequence
GGAGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAG
TAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATG
TGTAGCAGTGAAATAATATAGGGCT

> VII.V.11_Lac1f -- 15..330 of sequence
GGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAG
TAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
TGTAGCAGTGAAATAAAATTTTAT

> VII.V.12_Lac1f -- 10..316 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCA
GTAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAA
GCCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGGTGAAA

> VII.V.13_Lac1f -- 11..316 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAG
TAACTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAACTGCATCGGAAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
TGTAGCGGGTGAAA

> VII.V.14_Lac1f -- 10..314 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGA
GTAACTGTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCAAT
GTGTAGCCGGGTG

> VII.H.1_Lac1f -- 15..206 of sequence
AGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTGTTTCGGATCGTAAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGT
AACTGTTCATACGTATGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCA

> VII.H.2_Lac1f -- 8..308 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAG
AGTAACTGTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCA
TGTGTAGCG

> VII.H.4_Lac1f -- 38..315 of sequence
TTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTATCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCC
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCAT
CGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTGGA

> VII.H.7_Lac1f -- 9..315 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATA
GTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCAGTGAAAT

> VIII.V.3_Lac1f -- 9..318 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAG
AGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATAA

> VIII.H.1_Lac1f -- 28..315 of sequence
GTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTG
ACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTAT
CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCG
GAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTAAATGTGTAGCAGTGGAA

> VIII.H.2_Lac1f -- 28..315 of sequence
GTGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTG
ACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTAT
CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCG
GAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGGTGAA

> VIII.H.3_Lac1f -- 29..318 of sequence
TGTGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGA
CGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGG
AATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTGAAATAA

> VIII.H.5_Lac1f -- 32..326 of sequence
GAGCGGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGAC
GGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGA
AGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTGAAATAAATC
GGT

> IX.H.2_Lac1f -- 72..314 of sequence
CACGAGTGAGAGTAACTGTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGA

> IX.H.3_Lac1f -- 92..318 of sequence
GCCTTTATTTGACGGTAATTAATTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCG
GCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGC
GGGTGAAA

> IX.H.4_Lac1f -- 9..307 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCAAT
GTGTAGC

> IX.H.6_Lac1f -- 11..319 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACAGGGGTAG
TAACTGACCTTTGTTTGACGGTAATCAATTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCGAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
TGTAGCAGTGAAATAAA

> IX.H.12_Lac1f -- 9..314 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACAGGGGTA
GTAACTGACCTTTGTTTGACGGTAATCAATTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCGAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTAAAT
GTGTAGCAGGTGAA

> X.V.3_Lac1f -- 10..315 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAA
AGCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCA
TGTGTAGCAGTGAA

> X.V.9_Lac1f -- 15..317 of sequence
GCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACAGGGGTAGTAA
CTGGCCTTTGTTTGACGGTAATCAATCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGAAAGCCT
TCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCTAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGT
AGCAGTGAAAT

> X.V.10_Lac1f -- 228..251 of sequence
AGCCCCCCCGCCCCCCCCCCCGGA

> X.V.11_Lac1f -- 10..318 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACAGGGG
TAGTAACTGACCTTTGTTTGACGGTAATCAATTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGA
AAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCGAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTCC
ATGTGTAGCGGGTGAAA

> X.V.12_Lac1f -- 11..316 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGACAGGGGTA
GTAACTGACCTTTGTTTGACGGTAATCAATTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGCTCGATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTCGAGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAACTAAAT
GTGTAGCGGGTGAA

> X.H.3_Lac1f -- 9..308 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTACTC

> X.H.4_Lac1f -- 9..317 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTGTGGTGAAGAAAGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAA
AGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCA
TGTGTAGCGGTGGAATA

> XI.V.1_Lac1f -- 8..318 of sequence
TGATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGG
TAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGA
AAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCA
ATGTGTAGCGAGTGAAATA

> XI.V.2_Lac1f -- 8..306 of sequence
GATGGAGCACGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAATTCTGTTGTCAGAGAAGAACGTGCGTGAG
AGTAACTGTTCACGTATTGACGGTATCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCTTCGGCTTAACCGAAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCAA
TGTGTAG

> XI.H.1_Lac1f -- 18..314 of sequence
CACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGCGTGAGAGCAACTGT
TCACGCAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTTGG
CTTAACCAAAGAAGTGCATCGGAAACTGTCAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCA
GTGAA

> XI.H.2_Lac1f -- 13..317 of sequence
GGAGCACACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGCGTGAGAGC
AACTGTTCACGCAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGC
CTTTGGCTTAACCAAAGAAGTGCATCGGAAACTGTCAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCAATGT
GTAGCGGGTGAAA

> XI.H.3_Lac1f -- 14..317 of sequence
GGAGCACACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGCGTGAGAGC
AACTGTTCACGCAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGC
CTTTGGCTTAACCAAAGAAGTGCATCGGAAACTGTCAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT
GTAGCGGTGAAA

> XI.H.4_Lac1f -- 13..317 of sequence
GGAGCACACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGCGTGAGAGC
AACTGTTCACGCAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGC
CTTTGGCTTAACCAAAGAAGTGCATCGGAAACTGTCAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCAATGT
GTAGCCAGTGAAA

> XI.H.5_Lac1f -- 13..315 of sequence
GGAGCACACCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGCGTGAGAGC
AACTGTTCACGCAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGC
CTTTGGCTTAACCAAAGAAGTGCATCGGAAACTGTCAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT
GTAGCAGTGAA

> XI.H.6_Lac1f -- 91..313 of sequence
TCTAGTTCGACGGTACCTTACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCC
GAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTGAGC
TCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTTGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
TGAA

> XI.H.7_Lac1f -- 25..318 of sequence
TGTGTGTGAAGGCTTTAGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAGAATAGGGAATGATTCTAGT
TCGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACT
CCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTTGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCAGTGAAAT
AA

> XI.H.9_Lac1f -- 9..317 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCCTCGGCTTAACCGAGGAACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCAGTGAAATAA

> XII.V.3_Lac1f -- 12..314 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAG
TAACTGTTGCCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATG
TGTAGCGGTGA

> XII.V.4_Lac1f -- 9..317 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTGTAGTGAAGAAAGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAA
AGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCA
TGTGTAGCGGTGGAATA

> XII.V.5_Lac1f -- 11..319 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAGAATA
GGGAATGATTCTAGTTCGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTTGTAGAGGTAAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCAGTGAAATAA

> XII.H.1_Lac1f -- 11..316 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAG
TAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
TGTAGCAGTGAAAT

> XII.H.2_Lac1f -- 9..313 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGAA

> XIII.V.1_Lac1f -- 11..316 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTTGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAG
TAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
TGTAGCAGTGAAAT

> XIII.V.2_Lac1f -- 9..313 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCTGTCCC

> XIII.V.3_Lac1f -- 11..316 of sequence
TGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAG
TAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCAATG
TGTAGCGGTGAAAT

> XIII.V.4_Lac1f -- 11..315 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGTA
GTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCCCCCCC

> XIII.V.5_Lac1f -- 11..315 of sequence
CGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACAAATTGGAGAGT
AACTGCTCCAGTCTTGACGGTATCTTACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGGGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCACGGCTTAACCGTGGAAGTGCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGT
GTAGCAGTGAAAT

> XIII.V.6_Lac1f -- 8..312 of sequence
ATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTATTTGATA
GTAACTGATCATGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCAT
GTGTAGCGGTGAA

> XIII.V.7_Lac1f -- 72..288 of sequence
CAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGAAGAGGAA

9.4. Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1: DNA Ladder 100bp plus (AppliChem GmbH)..... - 27 -
Abb. 4-1: Probandin 1-10, rektale Abstriche von Probandin 1 (Tag 0,14,28) und von Probandin 2, 7, 8 (Tag 28) nicht vorhanden. ..... - 38 -
Abb. 4-2: Probandin 1-10, vaginale Abstriche von Probandin 2,7,8 (Tag 28) nicht vorhanden... - 38 -
Abb. 4-3: Probandin 11-23 ..... - 39 -
Abb. 4-4: Probandin 11-23 ..... - 39 -
Abb. 4-5: Probandin 24-33, rektale Abstriche von Probandin 30 (Tag 28) nicht vorhanden ..... - 40 -
Abb. 4-6: Probandin 24-33, vaginale Abstriche von Probandin 30 (Tag 28) nicht vorhanden..... - 40 -
Abb. 4-7: Probandin 34-43, rektale Abstriche von Probandin 34 (Tag 28) nicht vorhanden ..... - 41 -
Abb. 4-8: Probandin 34-43, vaginale Abstriche von Probandin 34 (Tag 28) nicht vorhanden..... - 41 -
Abb. 4-9: Probandin 44-50, ... - 42 -
Abb. 4-10: Probandin 44-50, ... - 42 -
Abb. 4-11: Probandin 1, rektale Abstriche sind nicht vorhanden ..... - 43 -
Abb. 4-12: Probandin 2; rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkte 3 (Tag 28) nicht vorhanden.. ..... - 43 -
Abb. 4-13: Probandin 3..... - 43 -
Abb. 4-14: Probandin 4..... - 44 -
Abb. 4-15. Probandin 5..... - 44 -
Abb. 4-16: Probandin 6..... - 44 -
Abb. 4-17: Probandin 7; rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkt 3 (Tag 28) nicht vorhanden… ..... - 45 -
Abb. 4-18: Probandin 8; rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkt 3 (Tag 28) nicht vorhanden.... ..... - 45 -
Abb. 4-19: Probandin 9..... - 45 -
Abb. 4-20: Probandin 10..... - 46 -
Abb. 4-21: Probandin 11..... - 46 -
Abb. 4-22: Probandin 12..... - 46 -
Abb. 4-23: Probandin 13..... - 47 -
Abb. 4-24: Probandin 14..... - 47 -
Abb. 4-25. Probandin 18..... - 47 -
Abb. 4-26: Probandin 19..... - 48 -
Abb. 4-27: Probandin 20..... - 48 -
Abb. 4-28: Probandin 21..... - 48 -
Abb. 4-29: Probandin 22..... - 49 -
Abb. 4-30: Probandin 23..... - 49 -
Abb. 4-31: Probandin 24..... - 49 -
Abb. 4-32: Probandin 25..... - 50 -
Abb. 4-33: Probandin 26..... - 50 -
Abb. 4-34: Probandin 27..... - 50 -

Abb. 4-35: Probandin 28 ..... - 51 -
Abb. 4-36: Probandin 29 ..... - 51 -
Abb. 4-37: Probandin 30, rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkt 3 (Tag 28) nicht vorhanden..
..... - 51 -
Abb. 4-38: Probandin 31 ..... - 52 -
Abb. 4-39: Probandin 32 ..... - 52 -
Abb. 4-40: Probandin 33 ..... - 52 -
Abb. 4-41: Probandin 34; rektale und vaginale Abstriche von Zeitpunkt 3 (Tag 28) nicht vorhanden..
..... - 53 -
Abb. 4-42: Probandin 35 ..... - 53 -
Abb. 4-43: Probandin 36 ..... - 53 -
Abb. 4-44: Probandin 37 ..... - 54 -
Abb. 4-45: Probandin 38 ..... - 54 -
Abb. 4-46: Probandin 39 ..... - 54 -
Abb. 4-47: Probandin 40 ..... - 55 -
Abb. 4-48: Probandin 41 ..... - 55 -
Abb. 4-49: Probandin 42 ..... - 55 -
Abb. 4-50: Probandin 43 ..... - 56 -
Abb. 4-51: Probandin 44 ..... - 56 -
Abb. 4-52: Probandin 45 ..... - 56 -
Abb. 4-53: Probandin 46 ..... - 57 -
Abb. 4-54: Probandin 47 ..... - 57 -
Abb. 4-55: Probandin 50 ..... - 57 -
Abb. 4-56: Vergleich der identifizierten Arten der beiden Habitate; Tag 0 ..... - 68 -
Abb. 4-57:Vergleich der identifizierten Arten der beiden Habitate; Tag 14 ..... - 68 -
Abb. 4-58: Vergleich der identifizierten Arten der beiden Habitate; Tag 28 ..... - 69 -
Abb. 4-59: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen Abstriche; Tag 0 ..... - 70 -
Abb. 4-60: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen Abstriche; Tag 14 ..... - 71 -
Abb. 4-61: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen Abstriche; Tag 28 ..... - 72 -
Abb. 4-62: Verteilung der identifizierten Arten der vaginalen Abstriche; Tag 0 ..... - 73 -
Abb. 4-63: Verteilung der identifizierten Arten der vaginalen Abstriche; Tag 14 ..... - 74 -
Abb. 4-64: Verteilung der identifizierten Arten der vaginalen Abstriche; Tag 28 ..... - 75 -
Abb. 4-65: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 1/1b - 4/2c, ... - 76 -
Abb. 4-66: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 4/3c – 8/1c ..... - 77 -
Abb. 4-67: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 8/2c - 12/1b ..... - 77 -
Abb. 4-68: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 12/2b – 18/3b ..... - 78 -
Abb. 4-69: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 18/1c – 21/2c ..... - 78 -
Abb. 4-70: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 21/3c – 25/1b ..... - 79 -
Abb. 4-71: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 25/2b – 28/3b ..... - 79 -
Abb. 4-72: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 28/1c – 32/1b ..... - 80 -
Abb. 4-73: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 32/2b – 35/2c ..... - 80 -

Abb. 4-74: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 35/3c – 39/1b .....- 81 -
Abb. 4-75: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 39/2b –42/3b .....- 81 -
Abb. 4-76: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 42/1c –46/2c.....- 82 -
Abb. 4-77: Enterokokken – spezifische PCR der Proben 42/1c –46/2c.....- 82 -
Abb. 5-1: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen und vaginalen Proben zum Zeitpunkt 1.....
.....- 84 -
Abb. 5-2: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen und vaginalen Proben zum Zeitpunkt 2.....
.....- 85 -
Abb. 5-3: Verteilung der identifizierten Arten der rektalen und vaginalen Proben zum Zeitpunkt 3.....
.....- 86 -
Abb. 5-4: Grafischer Darstellung der in Tab.5-12 dargestellten Ergebnisse der rektalen Abstriche….
..... …- 87 -
Abb. 5-5: Grafischer Darstellung der in Tab.5-13 dargestellten Ergebnisse der vaginalen Abstriche..
.....- 88 -
Abb. 5-6: Grafische Darstellung der in Tab. 5-4 dargestellten Gesamtzahlen der eindeutig.....- 90 -
Abb. 9-1: DGGE-Gel 1: Proben 1/1b-3/1b.....- 127 -
Abb. 9-2: DGGE – Gel 2: Proben 3/2b-4/2c.....- 128 -
Abb. 9-3: DGGE – Gel 3:Proben 4/3c-6/3b.....- 129 -
Abb. 9-4: DGGE – Gel 4: Proben 6/1c-8/1c.....- 130 -
Abb. 9-5: DGGE – Gel 5: 8/2c-10/3b.....- 131 -
Abb. 9-6: DGGE – Gel 6: Proben 10/1c-12/1b.....- 132 -
Abb. 9-7: DGGE – Gel 7: Proben 12/2b-13/2c.....- 133 -
Abb. 9-8: DGGE – Gel 8: Proben 13/3c-183b.....- 134 -
Abb. 9-9: DGGE – Gel 9: Proben 18/1c-20/1b.....- 135 -
Abb. 9-10: DGGE – Gel 10: Proben 20/2b-21/2c.....- 136 -
Abb. 9-11: DGGE – Gel 11. Proben 21/3c-23/3b.....- 137 -
Abb. 9-12: DGGE – Gel 12: Proben 23/1c-25/1b.....- 138 -
Abb. 9-13: DGGE – Gel 13: Proben 25/2b-26/2c.....- 139 -
Abb. 9-14: DGGE – Gel 14: Proben 26/3c-28/3b.....- 140 -
Abb. 9-15: DGGE – Gel 15: Proben 28/1c-30/1b.....- 141 -
Abb. 9-16: DGGE – Gel 16: Proben 30/2b-32/1b.....- 142 -
Abb. 9-17: DGGE – Gel 17: Proben 32/2b-33/2c.....- 143 -
Abb. 9-18: DGGE – Gel 18: Proben 33/3c-35/2c.....- 144 -
Abb. 9-19: DGGE – Gel 19: Proben 35/3c-37/3.....- 145 -
Abb. 9-20: DGGE – Gel 20: Proben 37/1c-39/1b.....- 146 -
Abb. 9-21: DGGE – Gel 21: Proben 39/2b-40/2c.....- 147 -
Abb. 9-22: DGGE – Gel 22: Proben 40/3c-42/3b.....- 148 -
Abb. 9-23: DGGE – Gel 23: Proben 42/1c-44/1b.....- 149 -
Abb. 9-24: DGGE – Gel 24: Proben 4/2b-46/2c.....- 150 -
Abb. 9-25: DGGE – Gel 25: Proben 46/3c-50/3b.....- 151 -
Abb. 9-26: DGGE – Gel 26: Proben 50/1c-50/3c.....- 152 -

9.5. Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* ..... - 5 -
Tab. 3-1: Referenzstämme für DGGE ..... - 18 -
Tab. 3-2: Sequenzen der Primer für DGGE und Sequenzierung (Walter et. al. 2001) ..... - 25 -
Tab. 3-3: PCR-Programm der in Tab. 3-2 verwendeten Primer für die Analyse der Proben mittels DGGE, 35 Zyklen (Walter et. al. 2001) ..... - 25 -
Tab. 3-4: PCR-Programm der in Tab. 3-2 verwendeten Primer der Referenzstämme für die Analyse mittels DGGE, 30 Zyklen (Walter et. al. 2001) ..... - 26 -
Tab. 3-5: PCR-Programm der in Tab. 3-2 verwendeten Primer für die Sequenzierung, 30 Zyklen (Walter et. al. 2001) ..... - 26 -
Tab. 3-6 Sequenzen der Primer für die Gattungsspezifische *Enterococcus* PCR ..... - 26 -
Tab. 3-7: PCR-Programm der, in Tab. 3-6 verwendeten, Primer für die gattungsspezifische *Enterococcus* PCR, 35 Zyklen (Rinttilä et. al. 2001) ..... - 26 -
Tab. 3-8: Agarose-Einwaage für 2%ige Gele ..... - 29 -
Tab. 3-9: Zusammensetzung der Gradientenlösung für DGGE ..... - 32 -
Tab. 4-1: Ergebnisse der Semiquantitativen Keimzahlbestimmung (N.V. = Probe nicht vorhanden) ..... - 36 -
Tab. 4-2: Referenzstäme für DGGE-Marker ..... - 58 -
Tab. 4-3: Ergebnisse der Sequenzierung ..... - 59 -
Tab. 4-4: Ergebnisse der Gesamtauswertung durch Bionumerics -Tag 0 ..... - 64 -
Tab. 4-5: Ergebnisse der Gesamtauswertung durch Bionumerics -Tag 14 ..... - 65 -
Tab. 4-6: Ergebnisse der Gesamtauswertung durch Bionumerics -Tag 28 ..... - 66 -
Tab. 5-1: Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten ..... - 84 -
Tab. 5-2: Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten ..... - 85 -
Tab. 5-3 Verteilung der mittels PCR-DGGE identifizierten Arten ..... - 86 -
Tab. 5-4: Vergleich der identifizierten Lactobacillen Arten der rektalen Abstriche ..... - 87 -
Tab. 5-5: Vergleich der identifizierten Lactobacillen Arten der vaginalen Abstriche ..... - 88 -
Tab. 5-6: Vergleich der Gesamtzahl (rektal und vaginal) für die Zeitpunkte 1-3 ..... - 89 -
Tab. 5-7: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 0 und Tag 14 ..... - 91 -
Tab. 5-8: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 0 und Tag 28 ..... - 92 -
Tab. 5-9: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 14 und Tag 28 ..... - 93 -
Tab. 5-10: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 0 und Tag 14 ..... - 94 -
Tab. 5-11: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 0 und Tag 14 ..... - 95 -
Tab. 5-12: Vergleich der Lactobacillenmikrobiota Tag 14 und Tag 28 ..... - 96 -
Tab. 5-13: Übereinstimmungen der rektalen und vaginalen Mikrobiota (bezogen auf 43 Probandinnen für Tag 0 und Tag 14, und 38 Probandinnen für Tag 28) ..... - 98 -
Tab. 5-14: Vergleich der identifizierten Isolate nach phylogenetischen Gruppen (Felis und Delagio, 2007) ..... - 99 -
Tab. 5-15: Vergleich der, zu verschiedenen Zeitpunkten, identifizierten rektalen Mikrobiota ..... - 99 -
Tab. 5-16: Vergleich der, zu verschiedenen Zeitpunkten, identifizierten vaginalen Mikrobiota ..... - 100 -

9.6. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Iris Schuhmeister
Geburtstag:	24.01.1973
Geburtsort:	Wien
Staatsangehörigkeit:	Österreich

Schulbildung

1979 – 1983	Volksschule Irenäusgasse, Wien
1983 – 1987	Gymnasium der Schulbrüder, Wien

Ausbildung

1987– 1993	Ausbildung zur Kindergartenpädagogin an der BAKIPÄD, 1210 Wien
seit 1993	Studium der Biologie/Studienzweig Genetik-Mikrobiologie an der Universität Wien

Tätigkeiten neben dem Studium

1993-1994	Kindergartenpädagogin, Sadt Wien
1994-2001	Tauchlehrerin, Adventure Pro DIVE
2001-2003	Supervisor, UCI Kinowelt
2003-2005	Kundenbeziehungsmanagerin, Mobilkom Austria
2005-2008	Trainerin, Mobilkom Austria
2009-2009	Kindergartenpädagogin, Kinder in Wien

Sonstige Qualifikationen

Sprachkenntnisse:	Englisch fließend, Französisch,
Sonstiges:	EDV- Kenntnisse, hier MS WORD, EXCEL; POWERPOINT