

**Abschlußbericht für das Projekt**  
**„Mikroflora von Arzneipflanzen- Identifizierung und Bewertung von**  
**Enterobacteriaceae-Isolaten“**

**Gefördert durch das Bayerische Staatsministerium für Wirtschaft, Verkehr und  
Technologie – Innovationsstelle Südbayern**

**Zuwendungsbescheid Nr.** 07 03/685 60/857/02 und 07 03/685 60/858/02

**Zuwendungsempfänger:** Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V.,  
Kranzweiherweg 10  
53489 Sinzig

**Forschungsstelle:** Labor L+S AG  
Mangelsfeld 4  
97708 Bad Bocklet

**Projektleitung:** Dr. Svenja Thiede, Dr. Gero Beckmann

**Laufzeit des Vorhabens:** 01. Mai 2002 – 15. Dezember 2002

**Inhalt:**

1. Veröffentlichungen
2. Danksagung
3. Zusammenfassung
4. Einleitung
5. Material und Methoden
6. Ergebnisse
7. Diskussion
8. Literatur
9. Anhang

## 1. Veröffentlichungen

Svenja Thiede, Gero Beckmann, Elmar Kroth, Bernd Sonnenschein (2002): Mentaler Kurzschluss: Enterobakterien auf Arzneipflanzen. *Swiss Pharma*, 24 (9a), 8-12

Die Ergebnisse des vorliegenden Projekts und eine Literaturstudie zum Thema sollen Ende 2002 in der **Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen** veröffentlicht werden. In Vorbereitung befinden sich

Svenja Thiede, Gero Beckmann: Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae* auf Arzneipflanzen. 1. Mitteilung: Literaturübersicht.

Svenja Thiede, Gero Beckmann: Mikroflora von Arzneipflanzen – *Enterobacteriaceae* gehören zur Normalflora. 2. Mitteilung: Eigene Untersuchungen.

Des Weiteren ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse in der **PharmInd** und ggf. eine englischsprachige Fassung in einem internationalen Journal geplant.

## 2. Danksagung

Dieses Projekt wurde durch die Landesgruppe Bayern in der Forschungsvereinigung der Arzneimittelhersteller (FAH e. V., Sinzig) initiiert und dankenswerter Weise gefördert durch einen anteiligen Zuschuss des Bayerischen Staatsministerium für Wirtschaft und Verkehr; Innovationsberatungsstelle Südbayern (Zuwendungsbescheid Nr. 07 03/685 60/857/02 und 07 03/685 60/858/02).

Unser Dank gilt ebenfalls den Kneipp-Werken, D-Würzburg und Bad Wörrishofen und der Firma Kräutermix, D-Abtswind für Geld- und Sachleistungen.

Für technische Hilfe sei Kristina Klüh und dem Team um Labordirektor Frank Kugler, Labor L+S AG, gedankt.

Die Firma Oxoid, Wesel, hat sich durch Sachleistungen beteiligt. Hier sei besonders Produktmanager Dr. Gerhard Tangen für die Einarbeitung in MicroLog 3.0 und die fachliche Unterstützung gedankt.

Herrn Dr. Rolf Reissbrodt, Robert-Koch-Institut Wernigerode, danken wir für das Interesse an dem Projekt, für Screening-Untersuchungen sowie für konstruktive Kritik.

### 3. Zusammenfassung

Im Rahmen des vorhergegangenen Projekts „Mikroflora von Arzneipflanzen“ konnte dem Mangel an Daten über die Mikroflora von ungetrockneten Arzneipflanzen in wesentlichen Punkten abgeholfen werden. Im Laufe dieses Projekts wurden von 249 Proben von Arzneipflanzen (Baldrian, Melisse, Petersilie) 1429 *Enterobacteriaceae*-Isolate gewonnen. Die Keimzahlen der *Enterobacteriaceae* lagen im Mittel deutlich über den für die Arzneimittelkategorien 3B bzw. 4B geforderten Maximalwerten für „Enterobakterien“. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob den strengen Anforderungen bezüglich der Belastung von Arzneipflanzen mit „Enterobakterien“ eine entsprechende Gefährdung des Menschen durch diese Mikroorganismen gegenübersteht.

Um entsprechende Hinweise zu erhalten, wurden die im vorangegangenen Projekt isolierten Bakterien mit zwei kommerziellen Identifizierungssystemen differenziert, um sie möglichst genau taxonomisch einzuordnen und die hygienische bzw. infektiologische Bedeutung abzuschätzen. Es zeigte sich, dass das natürliche Habitat aller Spezies unter anderem Umwelt, Boden, Wasser und Pflanzen sind. Die meisten der isolierten Spezies haben keine medizinische oder hygienische Bedeutung; lediglich einige wenige Spezies gelten als fakultativ humanpathogen, wobei sich die bekannt gewordenen Fälle von Infektionen mit solchen Isolaten zum weitaus überwiegenden Teil auf abwehrgeschwächte Krankenhauspatienten beziehen.

Keine der isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies gilt als obligat humanpathogen.

**In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen ist, dass nach gründlicher Literaturstudie war kein einziger dokumentierter Fall nachzuweisen war, bei dem es durch die orale Einnahme von pflanzlichen Arzneimitteln zu einer Infektion mit *Enterobacteriaceae* gekommen wäre.**

Wie die Ergebnisse des Projektes klar zeigen, sind *Enterobacteriaceae* auf Arzneipflanzen **kein Indikator für fäkale Verunreinigungen**. Sie gehören natürlicherweise zur Mikroflora von Arzneipflanzen und sollten daher nicht gemäßregelt werden. Vor diesem Hintergrund könnte der heimische Arznei-pflanzenanbau auf teure und qualitätsmindernde Entkeimungsverfahren weitgehend verzichten und würde so eine wirtschaftliche Stärkung erfahren, ohne das die Belange des Verbraucherschutzes beeinträchtigt würden.

Auf Grundlage der in den beiden Projekten erzielten Ergebnisse wird die FAH der Europäischen Arzneibuch-Kommission vorgeschlagen, die zulässige Konzentration der

Enterobakterien nicht zu beschränken und für *E. coli* ein Limit von  $1,0 \times 10^4$  KBE/g (ml) festzusetzen, wobei bei Nachweis von *E. coli* eine Überprüfung auf mögliche Pathogenitätsfaktoren erfolgen sollte.

#### 4. Einleitung

An die Qualität pflanzlicher Drogen werden hinsichtlich der Mikrobiologie in den Arzneibüchern hohe Anforderungen gestellt. Mit dem ersten Projektteil „Mikroflora von Arzneipflanzen“ (Zuwendungsbescheid Nr. 0703/685 60/771/00/1164/01/1165/02) konnte dem Mangel an Daten zu diesem Thema in wesentlichen Punkten abgeholfen werden. Am Beispiel von Melisse und Petersilie als Rohstoff für Blattdrogen und Baldrian als Wurzeldrogenrohstoff wurde gezeigt, dass Arzneipflanzen bereits während des Aufwuchses und vor der Ernte von einer Vielzahl von Bakterien besiedelt sind. Dies ist der Grund, weshalb die von den Arzneibüchern geforderte mikrobiologische Qualität natürlicherweise - d. h. ohne zusätzliche keimmindernde Maßnahmen - kaum einzuhalten ist.

Verschiedene Autoren haben bereits die mikrobiologische Belastung von Heil- und Gewürzpflanzen untersucht. Dabei wurden von den meisten Autoren Pflanzendrogen untersucht, also die getrockneten bzw. aufbereiteten Pflanzenteile, die zur Herstellung von Arzneizubereitungen oder für technische Zwecke verwendet werden, bzw. die getrocknete Gewürzpflanze oder das fertige Gewürzpulver (Beckmann et al. 1996, Friedrich und Schneider 1975, Graf und Scheer 1980, Schilcher 1982, Härtling 1987, Leimbeck 1987, Frank 1989, Kneifel und Berger 1994, Kabelitz 1996, Kolb 1999, Czech et al. 2001). Die verschiedenen Autoren fanden hier eine aerob mesophile Flora in Gesamtkeimzahlen von  $10^2$ - $10^8$  KBE/g, ohne jedoch die Herkunft der Keimbelastung erklären zu können. Zum Vergleich: pflanzliche Lebensmittel, die roh verzehrt werden, haben einen Gesamtkeimgehalt von bis zu  $10^9$  KBE/g (Frank 1989). Schneider (1987) hat auch frische Arzneipflanzen untersucht und den Keimgehalt von der Ernte bis zur fertigen Droge verfolgt. Dabei konnte er feststellen, dass am Beispiel von Melisse (*Melissa officinalis*) der aerob mesophile Gesamtkeimgehalt frischer Melisseblätter mit bis zu  $10^6$  KBE/g bereits über den Grenzwerten liegt. Er stellte die Vermutung an, dass die isolierten *Enterobacteriaceae* allem Anschein nach die natürliche Keimflora von Melissenblättern bilden, ohne jedoch Gattungen oder Spezies der Isolate beim Namen zu nennen. Alonzo

et al. (1994) haben verschiedene Arzneipflanzen direkt vom Feld gesammelt und jeweils die Hälfte der Probe direkt, die andere Hälfte nach der Trocknung untersucht. Sie vermuteten, dass *Enterobacteriaceae*, außer der epiphytischen Gattung *Erwinia*, auf Kontaminationen durch Mensch oder Tier zurückzuführen sind. Von den anderen isolierten *Enterobacteriaceae* werden lediglich Gattungsnamen (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) genannt (Alonzo et al. 1994). Nach einer Untersuchung von Leimbeck (1987) entsprachen nur 8,7% der untersuchten Teedrogen den damaligen Richtlinien der Federation Internationale Pharmaceutique (F.I.P). Die Untersuchung zeigte jedoch auch, dass im Falle von Kräutertees die Keimzahl durch ordnungsgemäße Heissaufgüsse so stark verringert wird, dass nur noch in einem Teil der Proben *Enterobacteriaceae* aus der Anreicherung nachzuweisen waren. Nach Andrews et al. (1980) gibt es vier Hauptfaktoren, die die Kontaminationsrate von Nutzpflanzen beeinflussen: die Physiologie des Blattes, die Aktivität von Vektoren (z. B. Vögel, Insekten, Spinnen), das Mikroklima (Beisp.: Blätter, die weiter innen an der Pflanze sitzen, sind feuchter und wärmer) und die Erreichbarkeit von Blättern für Mikroorganismen (z. B. Bodennähe). Alonzo et al. (1994) haben bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen festgestellt, dass die anatomische Feinstruktur der Pflanze ein wesentlicher Faktor für den Keimgehalt ist. So waren alle Pflanzen mit Härchen, Trichomen oder größeren rauen Flächen wesentlich stärker kontaminiert als solche mit kleinen, glatten Flächen. Dieses haben auch weitere Untersuchungen bestätigt (Beckmann et al. 1996).

Die Arzneibuchkommission hat in ihren Kriterien für die mikrobiologische Qualität von Fertigarzneimitteln zwar berücksichtigt, dass pflanzliche Drogen nicht keimfrei zu gewinnen sind. Einige Untersuchungsparameter müssen jedoch kritisch hinterfragt werden. Dies gilt im besonderen für den Begriff „Enterobakterien“. Es wird offensichtlich davon ausgegangen, dass von dieser Erregergruppe für den Konsumenten grundsätzlich eine Gefahr ausgeht. Nach dem Kommentar zum Europäischen Arzneibuch von Haberer (1999) ist die Annahme, es handele sich hier um Indikatoren für fäkale Kontamination, nicht richtig. Nach Haberer gelten „Enterobakterien“ als Indikatoren für eine Kontamination aus einer feuchten Umgebung mit organischer Verunreinigung. Der Autor stellt jedoch den Wert der Prüfung auf „Enterobakterien“ vor allem bei Arzneipflanzen deutlich in Frage, da es sich bei diesen Bakterien um einen Teil der natürlichen Mikroflora handele. Im Allgemeinen wird der Begriff „Enterobakterien“ als deutsche Übersetzung des lateinischen

Familiennamens „*Enterobacteriaceae*“ („Darmbakterien“) verstanden. Dabei handelt es sich um eine große taxonomische Familie fakultativ anaerober, gramnegativer, oxidasenegativer, nichtsporulierender Stäbchen, die u. a. Zucker als Kohlenstoffquelle nutzen. Sie kommen als Parasiten, Pathogene, Saprophyten oder Kommensalen im Darmkanal warmblütiger Tiere einschließlich dem Menschen und auf Pflanzen vor (Singleton 1995). Mehrere hundert Spezies sind beschrieben, und es werden ständig neue entdeckt (Farmer 1999). Zusätzlich ist zu bedenken, dass mit der vorgeschriebenen Methode bei der Prüfung auf Abwesenheit bzw. Keimgehalt von „Enterobakterien“ unter Umständen sowohl *Enterobacteriaceae* als auch andere gramnegative Bakterien mit erfasst werden (Wallhäußer 1995). All diese in ihrer hygienischen Bedeutung sehr unterschiedlichen Keime sind in dem Sammelbegriff „Enterobakterien“ enthalten. Die Prüfung auf „Enterobakterien“ für die mikrobiologische Qualität pharmazeutischer Zubereitungen wird übrigens außer von der Pharm. Eur. international von keinem anderen Arzneibuch gefordert (Haberer 1999). Ziel des zweiten Projektteils, welcher nahtlos an den ersten Teil anschließt, war es daher, die isolierten *Enterobacteriaceae* taxonomisch möglichst genau einzuordnen, um zeigen zu können, dass dieser Bakteriengruppe keine infektiologisch-hygienische Bedeutung im Zusammenhang mit Arzneimitteln zukommt. Durch die erzielten Ergebnisse wurden eindeutige Argumente gewonnen, die eine Änderung der Anforderungen unterstützen. Durch Keimzahlüberschreitungen entstehen Mehrkosten von 0,50-1,90 €/kg Droge plus 500 €/Charge für die Nachuntersuchungen (G. Beckmann, Labor L+S; M. Fischer, Kneipp-Werke AG, persönl. Mitt.) - Kosten, die durch die natürliche Mikroflora der Arzneipflanzen entstehen und so eine ständige Belastung für den heimischen Arzneipflanzenanbau darstellen.

## 5. Material und Methoden

Im Rahmen des Projekts 1 „Mikrobiologie von Arzneipflanzen“ wurden die gesammelten Proben von Melisse, Petersilie und Baldrian nach den Vorgaben des Europäischen Arzneibuches, Supplement 2000, mikrobiologisch untersucht. Dabei wurden unter anderem die Parameter „Enterobakterien“ und „*Escherichia coli*“ nach Vorgaben der Pharm. Eur. 3. Ausgabe, Nachtrag 2000 qualitativ und semiquantitativ erfasst, außerdem wurde qualitativ auf die Abwesenheit von Salmonellen untersucht.

Zum qualitativen Nachweis der „Enterobakterien“ wurden die Proben in Laktose-Bouillon vorbebrütet, in Mossel-Bouillon angereichert und auf VRBD-Agar (Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Dextrose) subkultiviert. Optisch unterschiedliche Kolonien wurden auf Columbia-Blutagar subkultiviert, und es wurde ein Cytochromoxidasetest (Fa. BAG, Lich) durchgeführt. Für den qualitativen Nachweis von *Escherichia (E.) coli* wurden die Proben in Peptonpuffer verdünnt, in nicht-selektiver Caso-Bouillon vorangereichert und in selektiver MacConkey-Bouillon angereichert. Aus der Anreicherung wurde auf MacConkey-Agar subkultiviert. *E. coli*-verdächtige Kolonien wurden auf Columbia-Blutagar subkultiviert und weiter untersucht. So wurden 1429 *Enterobacteriaceae*-Isolate gewonnen (im Jahr 2000 617 Isolate, im Jahr 2001 812 Isolate). Die Isolate wurden zunächst im API ID32E-Test (bioMérieux, Lyon, Frankreich) biochemisch differenziert. Diese „bunte Reihe“ ist ein System zur Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderer gramnegativer, nicht anspruchsvoller Stäbchen anhand von 32 standardisierten und miniaturisierten biochemischen Tests sowie einer Datenbasis. Sie ist hauptsächlich für klinische Isolate aus der Humanmedizin entwickelt worden. In der Datenbasis sind 71 *Enterobacteriaceae*-Spezies enthalten. Einige Isolate haben in diesem System keinen Speziesnamen erhalten. Um genauere taxonomische Erkenntnisse zu gewinnen und um abzusichern, dass es sich nicht um hygienisch relevante oder pathogene Erreger handelte, wurden 997 dieser Isolate in einem zweiten System näher charakterisiert. Dabei handelte es sich um das MicroLog 3.0-System (Fa. Biolog, Inc., Hayward, USA; Vertrieb: Fa. Oxoid, Wesel). Auch dieses System nutzt die Tatsache, dass Mikroorganismen Kohlenstoffquellen umsetzen. Auf einer 96-Well-Mikrotiter-Platte sind 95 verschiedene Zucker aufgebracht. Die respiratorische Umsetzung des Zuckers wird durch einen Tetrazolium-Redox-Farbstoff angezeigt. Jede Bakterienspezies zeigt durch die Kombination der umgesetzten Zucker einen charakteristischen „Fingerabdruck“. Das Ergebnis wird über ein Photometer eingelesen und mit einer Spezies-Datenbank abgeglichen. Das MicroLog-System ist unter anderem für pathogene Erreger und für Bakterienpopulationen aus der Umwelt entwickelt worden. 135 *Enterobacteriaceae*-Spezies sind in der Datenbank enthalten. Ein Vergleich der Datenbanken beider Systeme ist im Anhang aufgeführt.

## 6. Ergebnisse

Tab. 1 zeigt die im Laufe des Projekts 1 „Mikrobiologie von Arzneipflanzen“ untersuchten Proben.

Tab. 1: Probenart und Probenzahl in den Untersuchungsjahren 2000/2001

	Entnahmeort	gesamt	2000	2001
<b>Proben</b>		249	125	124
<b>Baldrian</b>		56	32	24
	Feld	28	12	16
	vor Trocknung	16	12	4
	nach Trocknung	12	8	4
<b>Melisse</b>		88	40	48
	Feld gesamt	60	28	32
	Schnitt 1	24	12	12
	Schnitt 2	26	14	12
	Schnitt 3	10	2	8
	vor Trocknung	16	8	8
	nach Trocknung	12	4	8
<b>Petersilie</b>		105	53	52
	Feld gesamt	59	31	28
	Schnitt 1	20	12	8
	Schnitt 2	15	7	8
	Schnitt 3	16	8	8
	Schnitt 4	8	4	4
	vor Trocknung	22	10	12
	nach Trocknung	24	12	12

Nach den Ergebnissen aus Projekt 1 konnten nur einzelne Baldrianproben die Anforderungen an die Kategorie 3B erfüllen, bei allen anderen Proben wurden die Grenzwerte um mindestens ein bis zwei Zehnerpotenzen überschritten. Auch für die Kategorie 4B wurde die Gesamtkeimzahl in den meisten Fällen überschritten oder lag an der oberen Grenze. Die Anforderungen für Kategorie 4A wurden von der Mehrheit der Proben erfüllt. Die Anforderungen der Kategorien 3B und 4B an die Höchstkeimzahlen der „Enterobakterien“ wurden im Mittel überschritten. Die Anforderungen der Arzneimittelkategorien nach Pharm. Eur., Supplement 5.1.4 zeigt Tab. 2. In Tab. 3-Tab. 11 sind die im Verlauf der Untersuchung ermittelten Gesamtkeimzahlen (aerob mesophile

Bakterien) und die Keimzahlen der *Enterobacteriaceae* bei den verschiedenen Probenarten vom Feld, vor und nach Trocknung aufgeführt (s. auch Abschlußbericht Projekt 1).

Tab. 2: Mikrobielle Qualität pharmazeutischer Zubereitungen, Pharm. Eur., 3. Ausgabe, 5.1.4 (aufgeführt sind hier nur die projektrelevanten Keimzahlen für aerob mesophile Bakterien (GKZ), „Enterobakterien“ und *E. coli*)

Zubereitung	Kategorie	Keimart	zugelassene Höchstkeimzahl
Zubereitungen zur oralen Anwendung, die <u>Rohmaterialien natürlicher Herkunft</u> enthalten (für die eine antimikrobielle Vorbehandlung nicht möglich ist und für die die zuständige Behörde eine Keimzahl des Rohmaterials von mehr als $10^3$ vermehrungsfähigen Mikroorganismen je g oder ml zulässt)	3B	aerob wachsende Bakterien Enterobakterien Escherichia coli	max. $10^4$ KBE/g (ml) max. $10^2$ KBE/g (ml) keine /g (ml)
<u>Pflanzliche Arzneimittel</u> , denen vor der Anwendung siedendes Wasser zugesetzt wird	4A	aerob wachsende Bakterien Escherichia coli	max. $10^7$ KBE/g (ml) max. $10^2$ KBE/g (ml)
<u>Andere pflanzliche Arzneimittel</u>	4B	aerobe wachsende Bakterien Escherichia coli Enterobakterien	max. $10^5$ KBE/g (ml) keine /g (ml) max. $10^3$ KBE /g (ml)

Tab. 3: *Melissa officinalis* L., Keimzahlen der auf dem Feld gezogenen Proben (KBE/g)

	2000 (n=28)			2001 (n=32)		
	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median
<b>GKZ</b>	$1,5 \times 10^6$	$7,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$6,8 \times 10^4$	$4,8 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$
<b>Enterobacteriaceae</b>	< 100	$1,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^4$	< 100	$1,4 \times 10^6$	$1,8 \times 10^4$

Tab. 4: *Melissa officinalis* L., Keimzahlen der vor Trocknung gezogenen Proben (KBE/g)

	2000 (n=8)			2001 (n=8)		
	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median
<b>GKZ</b>	$7,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	$2,9 \times 10^7$	$6,2 \times 10^6$
<b>Enterobacteriaceae</b>	< 100	$3,6 \times 10^6$	$8,5 \times 10^4$	< 100	$2,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$

Tab. 5: *Melissa officinalis* L., Keimzahlen der nach Trocknung gezogenen Proben (KBE/g)

	2000 (n=4) - Hordentrockner			2001 (n=8) - Bandtrockner		
	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median
<b>GKZ</b>	$7,9 \times 10^6$	$4,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
<b>Enterobacteriaceae</b>	$5,9 \times 10^3$	$1,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$

Tab. 6: *Petroselinum crispum* Hill, Keimzahlen auf dem Feld gezogener Proben (KBE/g)

	2000 (n=31)			2001 (n=28)		
	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median
<b>GKZ</b>	$9,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^5$
<b>Enterobacteriaceae</b>	< 100	$1,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^4$

Tab. 7: *Petroselinum crispum* Hill, Keimzahlen vor Trocknung gezogener Proben (KBE/g)

	2000 (n=10)			2001 (n=12)		
	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median
<b>GKZ</b>	$2,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$	$3,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^7$	$7,6 \times 10^5$
<b>Enterobacteriaceae</b>	$1,2 \times 10^4$	$9,3 \times 10^6$	$6,2 \times 10^5$	$9,5 \times 10^3$	$2,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$

Tab. 8: *Petroselinum crispum* Hill, Keimzahlen nach Trocknung gezogener Proben (KBE/g)

	2000 (n=12) - Bandtrockner			2001 (n=12) - Bandtrockner		
	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median
<b>GKZ</b>	$4,5 \times 10^4$	$2,4 \times 10^7$	$3,1 \times 10^6$	$7,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$
<b>Enterobacteriaceae</b>	$2,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$	$3,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$

Tab. 9: *Valeriana officinalis* L., Keimzahlen der auf dem Feld gezogenen Proben (KBE/g)

	2000 (n=12)			2001 (n=16)		
	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median
<b>GKZ</b>	$1,9 \times 10^6$	$5,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^6$
<b>Enterobacteriaceae</b>	< 100	$2,7 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	< 100	$2,3 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3$

Tab. 10: *Valeriana officinalis* L., Keimzahlen vor Trocknung gezogener Proben (KBE/g)

	2000 (n=12)			2001 (n=4)		
	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median
<b>GKZ</b>	$3,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$9,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
<b>Enterobacteriaceae</b>	< 100	$9,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$

Tab. 11: *Valeriana officinalis* L Keimzahlen nach Trocknung gezogener Proben (KBE/g)

	2000 (n=8)			2001 (n=4)		
	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Median</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Median</i>
<b>GKZ</b>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	2,6 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>4</sup>	7,4 x 10 <sup>4</sup>	3,4 x 10 <sup>4</sup>
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	< 100	2,0 x 10 <sup>4</sup>	9,5 x 10 <sup>3</sup>	< 100	2,0 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>4</sup>

### Nachweis von *Escherichia (E.) coli*

Der Nachweis von *Escherichia (E.) coli* wurde sowohl in der Anreicherung als auch im MPN-Verfahren nach den Vorgaben der Pharm. Eur. geführt. Anschließend wurden die Isolate in API ID32E differenziert. Insgesamt wurde *E. coli* in 49 der 249 Proben (20%) nachgewiesen.

Tab. 12: Proben, in denen *Escherichia (E.) coli* nachgewiesen wurde (in Klammern die Gesamtprobenzahl)

	<i>Feld</i>	<i>VOR Trocknung</i>	<i>NACH Trocknung</i>	<i>Gesamt</i>
<b>Melisse 2000</b>	4 (28)	4 (8)	0 (4)	8 (40) = 20%
<b>Melisse 2001</b>	6 (32)	1 (8)	2 (8)	9 (48) = 19%
<b>Petersilie 2000</b>	7 (31)	6 (10)	1 (12)	14 (53) = 26%
<b>Petersilie 2001</b>	3 (28)	8 (12)	3 (12)	14 (52) = 27%
<b>Baldrian 2000</b>	0 (12)	1 (12)	1 (8)	2 (32) = 6%
<b>Baldrian 2001</b>	2 (16)	0 (4)	0 (4)	2 (24) = 8%
<b><i>E. coli</i>-pos. Proben</b>	22 (93)	20 (54)	7 (48)	49 (249) = 20%

In 20 Fällen wurde *E. coli* nur aus der Anreicherung isoliert. Bei 12 Proben lag die Keimzahl im MPN-Verfahren <100 KBE/g, bei 9 Proben innerhalb der Grenzen >100<1000 KBE/g, in 7 Fällen wurde die Keimzahl innerhalb dieser Grenzen überschritten. Von jeder Probe, aus der *E. coli* isoliert und in API ID32E differenziert worden war, wurde mindestens ein Isolat zur Bestätigung in MicroLog 3.0 differenziert. Insgesamt wurden 54 von 81 *E. coli*-Isolaten in MicroLog 3.0 geprüft. Davon konnten 44 direkt als *E. coli* bestätigt werden. Zwei weitere Isolate konnten durch manuelle Verschiebung der Empfindlichkeitsgrenzen zwischen positiver und negativer Reaktion als *E. coli* bestätigt werden. Laut Hersteller ist die manuelle Verschiebung der Empfindlichkeitsgrenzen dann statthaft, wenn die vom Photometer als zweifelhaft erkannten Reaktionen optisch als positiv oder negativ aufgefasst werden oder wenn der Hintergrund so stark ist, dass eindeutige Reaktionen vom Photometer als zweifelhaft gelesen werden. Drei Isolate

erhielten von MicroLog 3.0 eine andere eindeutige Speziesdifferenzierung (*Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter nimipressualis*). 5 Isolate konnten in MicroLog 3.0 nicht identifiziert werden. Diese acht letztgenannten Isolate waren von API ID32E zu 99,9% als *E. coli* ohne abweichende Reaktionen differenziert worden.

Von der Spezies *E. coli* sind einige hundert Stämme mit z. T. sehr unterschiedlichen Eigenschaften bekannt. Nur einige wenige sind humanpathogen. *E. coli* wird auf Grund seiner Antigenstruktur in verschiedene Serotypen unterteilt. Einige Serotypen sind dafür bekannt, dass sich unter ihnen für bestimmte Tierarten oder den Menschen pathogene Stämme finden. Alle *E. coli*-Isolate wurden deshalb mit den polyvalenten Antiseren gegen potentiell humanpathogene Serotypen agglutiniert (Fa. Sifin, Berlin). Nur drei Isolate reagierten mit diesen Seren. Sie wurden im Hygiene Institut Hamburg, Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger, serotypisiert. Zwei Isolate gehörten zur O-Antigengruppe O107 mit nicht typisierbarer H-Phase. Diese beiden Isolate stammten von derselben Petersilien-Probe. Sie zeigten in MicroLog 3.0 unterschiedliche biochemische Profile, so dass es sich wahrscheinlich um zwei unterschiedliche Stämme handelte. Ein Isolat der Gruppe O107 ist im Jahr 2000 als EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) identifiziert worden (P. Roggentin, Hygiene Institut Hamburg, persönl. Mitt.). Das dritte Isolat erhielt die Typisierung H16 mit nicht typisierbarer O-Gruppe. Es war von Melisse isoliert worden.

### ***Enterobacteriaceae*-Isolate**

Im Rahmen des Projekts 1 wurden 1429 *Enterobacteriaceae*-Isolate in API ID32E differenziert. Hier zeichnete sich bereits ab, dass die meisten Spezies nur selten oder gar nicht im Zusammenhang mit einer klinischen Bedeutung gefunden werden. 636 Isolate erhielten in API ID32E eine Identifizierung auf Speziesebene. 793 Isolate konnten lediglich auf Gattungsebene identifiziert werden. 767 Isolate wurden als „*Pantoea* spp.“ differenziert, 23 Isolate konnten als „*Enterobacter* spp.“ identifiziert werden, zwei weitere als „*Klebsiella* spp.“ und eins als „*Proteus* spp.“.

Bei der Differenzierung der 1429 *Enterobacteriaceae*-Isolate in API ID32E wurden 44 verschiedene *Enterobacteriaceae* gefunden (Tab. 13).

Tab. 13: isolierte *Enterobacteriaceae* in den beiden Untersuchungsjahren

Spezies ID API ID32E	Isolate gesamt	2000	2001
Gesamtergebnis	1429	617	812
<i>Buttiauxella agrestis</i>	12	4	8
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	1	
<i>Citrobacter amalonaticus/farmeri</i>	1		1
<i>Citrobacter freundii</i> group	56	30	26
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1		1
<i>Enterobacter amnigenus</i>	57	22	35
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	4	1	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	109	46	63
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4		4
<i>Enterobacter intermedius</i>	30	14	16
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1		1
<i>Enterobacter</i> spp.	23	6	17
<i>Escherichia coli</i>	81	42	39
<i>Escherichia fergusonii</i>	2		2
<i>Escherichia vulneris</i>	10	5	5
<i>Ewingella americana</i>	4	4	
<i>Hafnia alvei</i>	32	18	14
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1		1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	19	13	6
<i>Klebsiella planticola</i>	10	8	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	1	2
<i>Klebsiella</i> spp.	2	1	1
<i>Klebsiella terrigena</i>	4	3	1
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	6	3	3
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	81	43	38
<i>Moellerella wisconsensis</i>	3		3
<i>Morganella morganii</i>	4	1	3
<i>Pantoea</i> spp. 1	714	277	437
<i>Pantoea</i> spp. 2	7	2	5
<i>Pantoea</i> spp. 3	38	18	20
<i>Pantoea</i> spp. 4	8	1	7
<i>Proteus</i> spp.	1		1
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1	1	
<i>Providencia rettgeri</i>	1		1
<i>Providencia rustigianii</i>	1		1
<i>Rahnella aquatilis</i>	47	34	13
<i>Serratia ficaria</i>	1		1
<i>Serratia fonticola</i>	7	1	6
<i>Serratia liquefaciens</i>	16	8	8
<i>Serratia marcescens</i>	3		3
<i>Serratia odorifera</i>	1		1
<i>Serratia plymuthica</i>	10	6	4
<i>Serratia proteamaculans</i>	5	2	3
<i>Serratia rubidaea</i>	7	1	6

Um mehr Sicherheit über die Identität dieser Isolate zu bekommen, wurden im Rahmen des zweiten Projekts 997 der 1429 *Enterobacteriaceae*-Isolate (70%) im MicroLog 3.0-System differenziert. Die Auswahl der Stämme erfolgte randomisiert. Dabei sollte

insbesondere für die auffallend vielen „*Pantoea* spp.“-Isolate eine genauere Identifizierung gefunden werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der beiden Systeme vergleichend gegenübergestellt. Grundsätzlich sind die Ergebnisse aller automatischen Differenzierungssysteme von der zugehörigen Datenbank abhängig. Die Datenbank beruht auf Daten von möglichst vielen Referenzstämmen einer Spezies. Da sich in der Bakteriologie relativ häufig aufgrund verfeinerter Untersuchungsmethoden namentliche Umbenennungen in Folge taxonomischer Neueinordnungen ergeben und zusätzlich ständig neue Spezies gefunden werden, stimmen die Datenbanken verschiedener Systeme nie hundertprozentig überein. Außerdem sind in den Datenbanken von API ID32E und MicroLog 3.0 unterschiedlich viele *Enterobacteriaceae*-Spezies enthalten. Einen Vergleich der Datenbanken zeigt die Tabelle im Anhang. Erschwerend kommt hinzu, dass Bakterienamen in der internationalen Nomenklaturliste zunächst als Vorschläge aufgenommen werden und die neuen Namen international in unterschiedlicher Weise in den Gebrauch einfließen. So ist es möglich, dass zwei verschiedene Bakterienamen für dieselbe Spezies synonym verwendet werden.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse fiel auf, dass längst nicht alle Differenzierungen übereinstimmten. 839 der 997 Isolate (84%) wurden in MicroLog 3.0 auf Speziesebene identifiziert. 137 Isolate (14%) konnten von MicroLog 3.0 nicht identifiziert werden, 21 (2%) konnten lediglich auf Gattungsebene identifiziert werden.

Tab. 14: Identifizierungsebene in MicroLog 3.0

	Species ID	Genus ID	No ID
997 Isolate in MicroLog 3.0	839	21	137

Bei der direkten Gegenüberstellung der 839 in beiden Systemen auf Speziesebene identifizierten Isolate ergab sich, dass 72% in beiden Systemen die gleiche oder eine - durch unterschiedliche Taxonomie bedingte - ähnliche Identifizierung erhielten. 14% der Isolate wurden von beiden Systemen der gleichen Gattung bzw. einer - wiederum taxonomisch bedingten - ähnlichen Gattung zugeordnet (Tab. 15). Tab. 16 zeigt, welche in API ID32E identifizierten Spezies in MicroLog 3.0 nicht oder auf Gattungsebene identifiziert wurden.



Tab. 16: Isolate, die in MicroLog 3.0 nicht oder nur auf Gattungsebene identifiziert wurden

Spezies Identifizierung API ID32E	Genus ID : <i>Citrobacter</i>	Genus ID : <i>Enterobacter</i>	Genus ID: <i>Escherichia</i>	Genus ID : <i>Klebsiella</i>	Genus ID : <i>Pantoea</i>	Genus ID : <i>Raoultella</i>	Genus ID : <i>Serratia</i>	No ID	Gesamtergebnis
<i>Buttiauxella agrestis</i>								5	<b>5</b>
<i>Citrobacter freundii</i>	1		1					4	<b>6</b>
<i>Escherichia coli</i>								5	<b>5</b>
<i>Enterobacter cancerogenus</i>								1	<b>1</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>		2						15	<b>17</b>
<i>Enterobacter intermedius</i>	1							12	<b>13</b>
<i>Enterobacter spp.</i>								2	<b>2</b>
<i>Escherichia fergusonii</i>								1	<b>1</b>
<i>Hafnia alvei</i>								9	<b>9</b>
<i>Klebsiella oxytoca</i>				1		1			<b>2</b>
<i>Klebsiella planticola</i>						1		2	<b>3</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>								1	<b>1</b>
<i>Leclercia adecarboxylata</i>		4						20	<b>24</b>
<i>Pantoea spp. 1</i>		2			3			27	<b>32</b>
<i>Pantoea spp. 2</i>					1			2	<b>3</b>
<i>Pantoea spp. 3</i>		2						5	<b>7</b>
<i>Pantoea spp. 4</i>								2	<b>2</b>
<i>Rahnella aquatilis</i>								6	<b>6</b>
<i>Serratia ficaria</i>								1	<b>1</b>
<i>Serratia fonticola</i>								2	<b>2</b>
<i>Serratia liquefaciens</i>								7	<b>7</b>
<i>Serratia marcescens</i>								1	<b>1</b>
<i>Serratia plymuthica</i>							1	3	<b>4</b>
<i>Serratia proteamaculans</i>								3	<b>3</b>
<i>Serratia rubidaea</i>								1	<b>1</b>
<b>Gesamtergebnis</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>137</b>	<b>158</b>

23 Isolate wurden zusätzlich am Robert-Koch-Institut Wernigerode mit der offiziellen „bunten Reihe“ „Bactid“ des CDC Atlanta, USA, untersucht. Auch zu diesem 47 Reaktionen enthaltenden biochemischen System gehört eine umfangreiche Datenbank. Nur 11 der Isolate erhielten eine Speziesidentifizierung, 12 Isolate konnten nicht

identifiziert werden. Die Bactid-Speziesdifferenzierungen wichen z. T. von denen, die durch die Systeme API ID32E bzw. in MicroLog 3.0 ermittelt wurden, ab (Tab. 17).

Tab. 17: Vergleich von 23 Isolaten in drei Differenzierungssystemen

Isolat-Nummer	Api ID32E	MicroLog 3.0	Bactid
002-01	<i>Pantoea</i> spp. 1	<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 6 ( <i>Pectobacterium</i> )	nicht identifiziert
002-02	<i>Pantoea</i> spp. 1	<i>Pantoea agglomerans</i>	nicht identifiziert
009-02	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	nicht identifiziert
011-09	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
025-01	<i>Pantoea</i> spp. 1	<i>Pantoea agglomerans</i>	nicht identifiziert
025-02	<i>Pantoea</i> spp. 1	nicht identifiziert	<i>Enterobacter agglomerans</i> group
032-09	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	nicht identifiziert
037-06	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	nicht identifiziert
037-12	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 5	<i>Enterobacter agglomerans</i>
039-05	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Enterobacter nimipressualis</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> group
045-07	<i>Enterobacter cloacae</i>	nicht identifiziert	<i>Enterobacter cloacae</i>
053-05	<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Buttiauxella agrestis</i>	nicht identifiziert
090-08	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Yokenella regensburgei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
098-03	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 5	<i>Enterobacter agglomerans</i>
102-04	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	nicht identifiziert
156-06	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	nicht identifiziert
169-02	<i>Pantoea</i> spp. 1	<i>Rahnella aquatilis</i>	nicht identifiziert
196-05	<i>Citrobacter amalonaticus/farmeri</i>	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
198-07	<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Enterobacter nimipressualis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
220-03	<i>Pantoea</i> spp. 4	<i>Pantoea agglomerans</i>	nicht identifiziert
224-05	<i>Pantoea</i> spp. 3	<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 7 ( <i>Pantoea</i> )	<i>Enterobacter agglomerans</i> group
226-07	<i>Pantoea</i> spp. 4	nicht identifiziert	nicht identifiziert
231-01	<i>Pantoea</i> spp. 3	nicht identifiziert	<i>Enterobacter agglomerans</i> group

### „*Pantoea* spp.“

In API ID32E wurden 767 Isolate als „*Pantoea* spp.“ identifiziert, und zwar 714 mal als „*Pantoea* spp. 1“, siebenmal als „*Pantoea* spp. 2“, 38 mal als „*Pantoea* spp. 3“ und achtmal als „*Pantoea* spp. 4“. 506 dieser Isolate wurden in MicroLog 3.0 differenziert. 462 wurden hier auf Speziesebene identifiziert. In Tab. 18 ist die Identifizierungsebene

aufgelistet.

Tab. 18: MicroLog 3.0-Ergebnis von 506 in API ID32E als „*Pantoea* spp.“ identifizierten Isolaten

	Genus ID : <i>Enterobacter</i>	Genus ID: <i>Pantoea</i>	No ID	Spezies ID	Gesamtergebnis
<i>Pantoea</i> spp. 1	2	3	27	435	<b>467</b>
<i>Pantoea</i> spp. 2		1	2	1	<b>4</b>
<i>Pantoea</i> spp. 3	2		5	23	<b>30</b>
<i>Pantoea</i> spp. 4			2	3	<b>5</b>
<b><i>Pantoea</i> spp. gesamt</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>36</b>	<b>462</b>	<b>506</b>

Tab. 19 zeigt die Ergebnisse der in MicroLog 3.0 auf Speziesebene identifizierten „*Pantoea* spp.“-Isolate. 416 Isolate (90%) wurden hier als *Enterobacter agglomerans*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea dispersa* oder *Pantoea stewartii* identifiziert, erhielten also eine dem API ID32E-Ergebnis entsprechende Spezieszuordnung. Dabei wurden 354 Isolate (77%) als *Pantoea agglomerans* bezeichnet.

Tab. 19: Speziesidentifizierungen der „*Pantoea* spp.“ in MicroLog 3.0

Identifizierung in API ID32E	Pantoea spp. 1	Pantoea spp. 2	Pantoea spp. 3	Pantoea spp. 4	Gesamtergebnis
	Speziesidentifizierung in MicroLog 3.0				
<i>Citrobacter braakii</i>	1				1
<i>Citrobacter murliniae</i>			1		1
<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 6 ( <i>Pectobacterium</i> )	20				20
<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 7 ( <i>Pantoea</i> )	14		10		24
<i>Enterobacter amnigenus</i>	4				4
<i>Enterobacter cloacae</i>	11		4		15
<i>Enterobacter gergoviae</i>	5				5
<i>Enterobacter nimipressuralis</i>			1		1
<i>Escherichia coli</i>	3				3
<i>Kluyvera cochleae</i>	1				1
<i>Moellerella wisconsensis</i>	1				1
<i>Pantoea agglomerans</i>	350		1	3	354
<i>Pantoea dispersa</i>	8	1	1		10
<i>Pantoea stewartii</i> ssp. <i>stewartii</i>	8				8
<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>atrosepticum</i>	2				2
<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i>	1				1
<i>Rahnella aquatilis</i>	6		4		10
<i>Raoultella terrigena</i>			1		1
<b>Gesamtergebnis</b>	<b>435</b>	<b>1</b>	<b>23</b>	<b>3</b>	<b>462</b>

MicroLog 3.0 bietet die Möglichkeit, Daten verschiedener Isolate zu „clustern“, um die Ähnlichkeit untereinander sichtbar zu machen. Dadurch lässt sich anhand eines „Verwandtschaftsbaumes“ erkennen, ob es sich hierbei im Idealfall immer um ein und dieselbe nicht identifizierbare Spezies handelt bzw. wie nah die Isolate miteinander verwandt sind. Die 36 von MicroLog 3.0 nicht identifizierten „*Pantoea* spp.“-Isolate wurden in ein Cluster eingespeist. Die Clusteranalyse zeigt jeweils eine Gruppierung mehrerer Isolate und einen hohen Verwandtschaftsgrad fast aller Isolate, jedoch handelt es sich offensichtlich immer noch um verschiedene Spezies (Abb. 1).

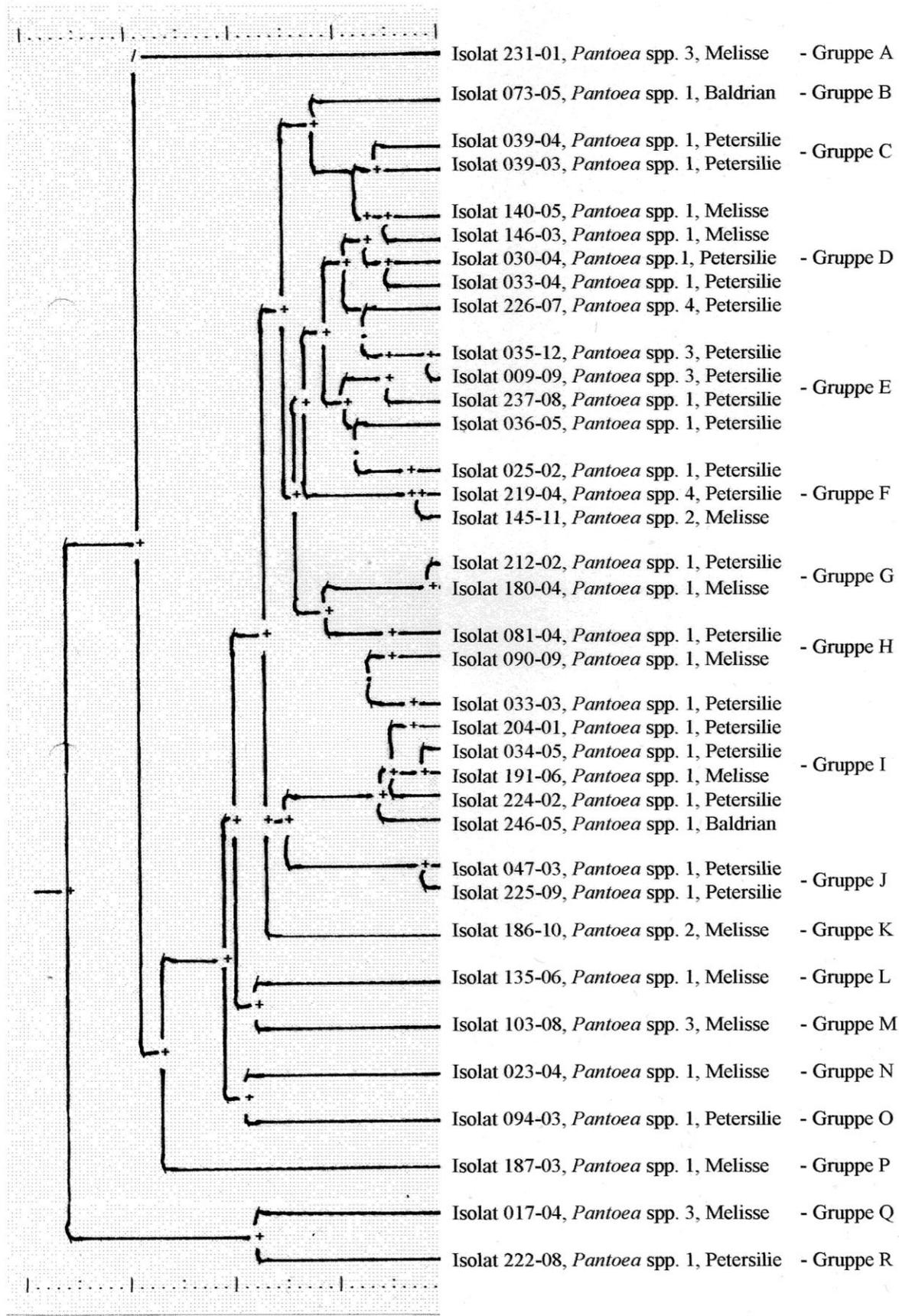


Abb. 1: Cluster der in MicroLog 3.0 nicht identifizierten „*Pantoea* spp.“-Isolate

Um die Schwierigkeiten mit der „*Pantoea*-Taxonomie“ zu verdeutlichen, zeigt *Tab. 20* einen Vergleich der aktuellen Nomenklaturliste mit den in den beiden Identifizierungssystemen enthaltenen *Pantoea* spp.-Bezeichnungen.

*Tab. 20:* Vergleich der *Pantoea* spp. in der aktuellen Nomenklaturliste mit den Bezeichnungen in den Datenbanken der Identifizierungssysteme

Internat. list of bacterial names in standing nomenclature	API ID32E	MicroLog 3.0
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea</i> spp. 1	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>betae</i>	<i>Pantoea</i> spp. 2	<i>Pantoea citrea</i>
<i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>gypsophilae</i>	<i>Pantoea</i> spp. 3	<i>Pantoea dispersa</i>
<i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>milletiae</i>	<i>Pantoea</i> spp. 4	<i>Pantoea punctata</i>
<i>Pantoea ananatis</i>		<i>Pantoea stewartii</i> ss <i>stewartii</i>
<i>Pantoea cedenensis</i>		<i>Pantoea terrea</i>
<i>Pantoea citrea</i>		<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 2
<i>Pantoea dispersa</i>		<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 3
<i>Pantoea endophytica</i>		<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 4 ( <i>Pantoea</i> )
<i>Pantoea oleae</i>		<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 5
<i>Pantoea stewartii</i>		<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 6 ( <i>Pectobacterium</i> )
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>		<i>Enterobacter agglomerans</i> bgp 7 ( <i>Pantoea</i> )
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>		
<i>Pantoea toletana</i>		
<i>Pantoea</i> sp.		
<i>Pantoea</i> sp. 'Cibuni media isolate 74'		
<i>Pantoea</i> sp. 57916		
<i>Pantoea</i> sp. 57917		
<i>Pantoea</i> sp. 77000		
<i>Pantoea</i> sp. 82353		
<i>Pantoea</i> sp. A5		
<i>Pantoea</i> sp. B232		
<i>Pantoea</i> sp. B40		
<i>Pantoea</i> sp. P101		
<i>Pantoea</i> sp. P102		
<i>Pantoea</i> sp. YSS/2001-2		

## Siderophore

Bakterien benötigen, wie alle anderen Lebewesen, Eisen für diverse Stoffwechselfvorgänge (Neilands 1972, Litwin und Calderwood 1993). Da freies Eisen für Zellen toxisch ist, ist es in Tieren und Pflanzen an Speicher- und Transportproteine wie z.B. Ferritin oder Transferrin gebunden. Siderophore sind Eisenchelatoren, die es den Bakterien ermöglichen, an Transport- oder Speicherproteine des Wirts gebundenes Eisen zu akquirieren und in die eigene Zelle aufzunehmen (Bagg und Neilands 1987). Ohne einen solchen hochaffinen Eisenaufnahmemechanismus können Bakterien nicht im oder auf dem Wirt überleben, weshalb die Fähigkeit zur Bildung von Siderophoren als Pathogenitätsfaktor gilt. Das Fehlen von Siderophoren oder einem anderen Mechanismus

zur Aufnahme komplexgebundenen Eisens würde bedeuten, dass solche Bakterien wahrscheinlich keine Pflanzen besiedeln können. *Enterobacteriaceae* sind in der Lage, verschiedene Siderophore zu bilden (Reissbrodt 1994). Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von Siderophoren: Phenolate, wie z. B. das Enterobactin, welches von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* synthetisiert wird und auch bei anderen *Enterobacteriaceae* gefunden wird (Earhardt 1996), und Hydroxamate wie z. B. das Aerobactin, welches zuerst bei *Enterobacter aerogenes* nachgewiesen wurde (Gibson und Magrath 1969). Im Robert-Koch-Institut Wernigerode, AG Dr. Reissbrodt, wurden mit einigen Stämmen Wachstumsversuche durchgeführt um zu zeigen, ob die Isolate Siderophore bilden können. Dabei wurden verschiedene Bakterienstämme, die nicht in der Lage sind, selber Siderophore zu bilden (Indikatorstämme), in ein festes Eisenmangelmedium eingegossen. Eisenmangel führt dazu, dass Bakterien hochaffine Eisenaufnahmemechanismen exprimieren müssen, um zu überleben. Die Medien wurden dann mit den zu testenden Isolaten beimpft. Zeigten die Indikatorstämme Wachstum, so bedeutete dies, dass das zu testende Isolat in der Lage war, die jeweils fehlenden Siderophore zu bilden und an die Umgebung und den Indikatorstamm abzugeben. Insgesamt wurden 22 Isolate verschiedener Spezies getestet. Alle Isolate bildeten verschiedene Siderophore, was nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens zu erwarten war (Tab. 21). Da die Versuche keine ungewöhnlichen Ergebnisse brachten, wie z. B. Isolate ohne Siderophore oder Hinweis auf eine besondere Pathogenität, wurde die Fragestellung nicht weiter verfolgt.

Tab. 21: Nachweis von Siderophoren bei ausgewählten Isolaten

- Enb 7: *Salmonella typhimurium*-Stamm, der die Bildung von Phenolat- und Hydroxamatsiderophoren außer Aerobactin anzeigt  
 TA2700: *Salmonella typhimurium*-Stamm, der Enterobactin anzeigt  
 LG1522: *E. coli*-Stamm, der Aerobactin anzeigt  
 H5030: *Yersinia enterocolitica*-Stamm, der Phenolat- und Hydroxamatsiderophore außer Aerobactin anzeigt  
 JG9: *Mycobacterium flavescens*-Stamm, der Hydroxamatsiderophore außer Aerobactin und  $\alpha$ -Keto- $\alpha$ -Hydroxysäuren anzeigt

Wachstumszonen der Indikatorstämme in Millimeter

Isolat- Nummer	Api ID32E- Identifizierung	Enb 7	TA2700	LG1522	H5030	JG9
002-01	<i>Pantoea</i> spp. 1	45	0	0	28	40
002-02	<i>Pantoea</i> spp. 1	35	22	0	25	36
009-02	<i>Rahnella aquatilis</i>	40	0	0	30	38
011-09	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	24	35	25	0
025-01	<i>Pantoea</i> spp. 1	28	24	0	28	35
025-02	<i>Pantoea</i> spp. 1	30	0	42	30	45
032-09	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	28	28	0	22	0
037-06	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	34	32	0	24	0
037-12	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	30	30	0	22	0
039-05	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	30	20	0	22	0
053-05	<i>Buttiauxella agrestis</i>	24	24	0	24	0
090-08	<i>Hafnia alvei</i>	45	0	0	28	40
098-03	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	25	24	0	20	0
102-04	<i>Rahnella aquatilis</i>	30	0	0	26	45
156-06	<i>Enterobacter gergoviae</i>	25	20	0	24	40
169-02	<i>Pantoea</i> spp. 1	16	14	32	18	0
196-05	<i>Citrobacter amalonaticus/farmeri</i>	32	30	0	20	0
198-07	<i>Enterobacter amnigenus</i>	34	30	0	26	0
220-03	<i>Pantoea</i> spp. 4	30	0	30	18	40
224-05	<i>Pantoea</i> spp. 3	30	30	0	24	0
226-07	<i>Pantoea</i> spp. 4	30	28	0	24	0
231-01	<i>Pantoea</i> spp. 3	35	0	0	16	42

## Verteilung der *Enterobacteriaceae* auf die drei Probenarten

Bei der Aufschlüsselung der Ergebnisse nach Probenart fiel auf, dass von Baldrianwurzeln wesentlich weniger *Enterobacteriaceae* isoliert wurden als von Melisse- und Petersilienblättern (Tab. 22).

Tab. 22: Anzahl *Enterobacteriaceae*-Isolate von den verschiedenen Probenarten

Probe	Isolate gesamt	Baldrian	Baldrian 2000	Baldrian 2001	Melisse	Melisse 2000	Melisse 2001	Petersilie	Petersilie2000	Petersilie2001
<b>Isolate</b>	<b>1429</b>	<b>243</b>	<b>123</b>	<b>120</b>	<b>486</b>	<b>184</b>	<b>302</b>	<b>700</b>	<b>310</b>	<b>390</b>

Tab. 23 zeigt die Anzahl der Isolate je Spezies von den drei Probenarten in den beiden Untersuchungsjahren. Es fällt auf, dass nur von 13 *Enterobacteriaceae*-Spezies zehn oder mehr Isolate von mindestens einer Pflanzenart gewonnen werden konnten. Von elf Spezies gab es nur jeweils ein Isolat, von weiteren zehn Spezies nur zwei bis vier Isolate insgesamt. Zehn Spezies wurden fünf- bis 16fach isoliert, wobei in einem Fall neun, sonst höchstens sechs Isolate je Pflanzenart zu verzeichnen waren.

Tab. 23: Verteilung der *Enterobacteriaceae*-Spezies (Identifizierung nach API ID32E) auf die drei Probenarten

Spezies ID API ID32E	Baldrian	Baldrian 2000	Baldrian 2001	Melisse	Melisse 2000	Melisse 2001	Petersilie	Petersilie 2000	Petersilie 2001
<b>Isolate gesamt</b>	<b>243</b>	<b>123</b>	<b>120</b>	<b>486</b>	<b>184</b>	<b>302</b>	<b>700</b>	<b>310</b>	<b>390</b>
<i>Buttiauxella agrestis</i>				9	3	6	3	1	2
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	1							
<i>Citrobacter amalonaticus/farmeri</i>							1		1
<i>Citrobacter freundii</i>	12	5	7	17	10	7	27	15	12
<i>Escherichia coli</i>	4	2	2	28	13	15	49	27	22
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1		1						
<i>Enterobacter amnigenus</i>	41	16	25	5	1	4	11	5	6
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2		2	1	1		1		1
<i>Enterobacter cloacae</i>	31	10	21	36	14	22	42	22	20
<i>Enterobacter gergoviae</i>				4		4			
<i>Enterobacter intermedius</i>	9	7	2	10	4	6	11	3	8
<i>Enterobacter sakazakii</i>							1		1
<i>Enterobacter spp.</i>	14		14	5	2	3	4	4	
<i>Escherichia fergusonii</i>				2		2			
<i>Escherichia vulneris</i>	2	1	1	2	1	1	6	3	3
<i>Ewingella americana</i>	1	1		1	1		2	2	
<i>Hafnia alvei</i>	4	3	1	22	12	10	6	3	3
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>				1		1			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1		7	5	2	11	7	4
<i>Klebsiella planticola</i>	6	6		1	1		3	1	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				2		2	1	1	
<i>Klebsiella spp.</i>							2	1	1
<i>Klebsiella terrigena</i>				4	3	1			
<i>Kluyvera cryocrescens</i>				1		1	5	3	2
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	17	10	7	25	8	17	39	25	14
<i>Moellerella wisconsensis</i>							3		3
<i>Morganella morganii</i>				1		1	3	1	2
<i>Pantoea spp. 1</i>	47	31	16	258	86	172	409	160	249
<i>Pantoea spp. 2</i>	2		2	3		3	2	2	
<i>Pantoea spp. 3</i>				12	6	6	26	12	14
<i>Pantoea spp. 4</i>				2	1	1	6		6
<i>Proteus spp.</i>							1		1
<i>Providencia alcalifaciens</i>							1	1	
<i>Providencia rettgeri</i>				1		1			
<i>Providencia rustigianii</i>				1		1			
<i>Rahnella aquatilis</i>	27	20	7	9	7	2	11	7	4
<i>Serratia ficaria</i>	1		1						
<i>Serratia fonticola</i>				6	1	5	1		1
<i>Serratia liquefaciens</i>	5	2	3	5	3	2	6	3	3
<i>Serratia marcescens</i>	2		2				1		1
<i>Serratia odorifera</i>				1		1			
<i>Serratia plymuthica</i>	10	6	4						
<i>Serratia proteamaculans</i>	2	1	1	3	1	2			
<i>Serratia rubidaea</i>	1		1	1		1	5	1	4

Die am häufigsten isolierten Spezies waren *Pantoea spp. 1* (714 Isolate), *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia coli*, *Enterobacter amnigenus* und *Citrobacter freundii* (group) mit jeweils über 50 Isolaten (Tab. 24). Die *Pantoea spp. 1-*

Isolate wurden zum größten Teil in MicroLog 3.0 als *Pantoea agglomerans* identifiziert (350 von 435 Isolaten, s. Kap. „*Pantoea* spp.“). Von den in API als *Leclercia adecarboxylata* identifizierten Isolaten wurde keines in MicroLog 3.0 bestätigt. 35 von 41 dieser Stämme wurden einer *Enterobacter*-Spezies zugeordnet. Weitere biochemische Untersuchungen bestätigten, dass es sich hierbei nicht um *Leclercia* handelte. Über die Hälfte der *E. coli*-Isolate war von Petersilie isoliert worden, darunter die beiden O107-Stämme. Nur 49 der 767 *Pantoea* ssp.-Isolate (6%) wurden von Baldrian isoliert, der überwiegende Teil wurde von den Blattdrogen isoliert.

Vor dem Hintergrund der zum Teil doch erheblich unterschiedlichen Differenzierungen in den beiden verwendeten Systemen scheint eine Auswertung im Hinblick auf eine pflanzenarttypische Kombination verschiedener *Enterobacteriaceae*-Spezies nicht sinnvoll. Um eine fundierte Aussage über Bakterienpopulationen auf Kräutern machen zu können, müsste man verfeinerte Isolierungs- und Differenzierungsmethoden (u. a. molekularbiologisch) und ggf. histologische Untersuchungen einsetzen, was im Rahmen dieses Projekts nicht bewerkstelligt werden konnte.

Tab. 24: Anzahl der *Enterobacteriaceae*-Isolate auf den drei Probenarten,  
sortiert nach Häufigkeit (Identifizierung nach API ID32E)

Spezies ID API	Baldrian	Melisse	Petersilie	Isolate gesamt
<b>Gesamtergebnis</b>	<b>243</b>	<b>486</b>	<b>700</b>	<b>1429</b>
<i>Pantoea</i> spp. 1	47	258	409	714
<i>Enterobacter cloacae</i>	31	36	42	109
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	17	25	39	81
<i>E.coli</i>	4	28	49	81
<i>Enterobacter amnigenus</i>	41	5	11	57
<i>Citrobacter freundii</i>	12	17	27	56
<i>Rahnella aquatilis</i>	27	9	11	47
<i>Pantoea</i> spp. 3		12	26	38
<i>Hafnia alvei</i>	4	22	6	32
<i>Enterobacter intermedius</i>	9	10	11	30
<i>Enterobacter</i> spp.	14	5	4	23
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	7	11	19
<i>Serratia liquefaciens</i>	5	5	6	16
<i>Buttiauxella agrestis</i>		9	3	12
<i>Serratia plymuthica</i>	10			10
<i>Klebsiella planticola</i>	6	1	3	10
<i>Escherichia vulneris</i>	2	2	6	10
<i>Pantoea</i> spp. 4		2	6	8
<i>Serratia rubidaea</i>	1	1	5	7
<i>Serratia fonticola</i>		6	1	7
<i>Pantoea</i> spp. 2	2	3	2	7
<i>Kluyvera cryocrescens</i>		1	5	6
<i>Serratia proteamaculans</i>	2	3		5
<i>Morganella morganii</i>		1	3	4
<i>Klebsiella terrigena</i>		4		4
<i>Ewingella americana</i>	1	1	2	4
<i>Enterobacter gergoviae</i>		4		4
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2	1	1	4
<i>Serratia marcescens</i>	2		1	3
<i>Moellerella wisconsensis</i>			3	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		2	1	3
<i>Klebsiella</i> spp.			2	2
<i>Escherichia fergusonii</i>		2		2
<i>Serratia odorifera</i>		1		1
<i>Serratia ficaria</i>	1			1
<i>Providencia rustigianii</i>		1		1
<i>Providencia rettgeri</i>		1		1
<i>Providencia alcalifaciens</i>			1	1
<i>Proteus</i> spp.			1	1
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>		1		1
<i>Enterobacter sakazakii</i>			1	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1			1
<i>Citrobacter amalonaticus/farmeri</i>			1	1
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1			1

## 7. Diskussion

Bereits im ersten Projektteil „Mikrobiologie von Arzneipflanzen“ konnte gezeigt werden, dass Kräuter bereits während des Aufwuchses von einer Vielzahl von Bakterien besiedelt sind. So kann die von den Arzneibüchern geforderte mikrobiologische Qualität ohne zusätzliche keimmindernde Maßnahmen kaum eingehalten werden. Der Grund für die verhältnismäßig strenge Maßregelung nach Pharm. Eur. bleibt unklar, insbesondere für den Parameter „Enterobakterien“. Haberer (1999) schreibt in einem Kommentar zum Europäischen Arzneibuch, dass es sich bei „Enterobakterien“ nicht automatisch um Fäkalkeime handelt, sondern höchstens um Indikatoren für eine Kontamination aus einer feuchten Umgebung mit organischer Verunreinigung. Außerdem weist er darauf hin, dass der Wert der Prüfung in Frage zu stellen sei, da es sich bei diesen „Enterobakterien“ um einen Teil der natürlichen Mikroflora der Arzneipflanzen handele. Eine gewisse organische Verunreinigung ergibt sich aus der belebten Umwelt der im Freien angebauten Pflanzen. Nach Pharm. Eur. wird eine Differenzierung der „Enterobakterien“ nicht gefordert, so dass obligat oder fakultativ humanpathogene Erreger und apathogene Organismen nicht unterschieden werden. Eine Untersuchung auf die obligat pathogenen Salmonellen und auf *E. coli* erfolgt zusätzlich. Die isolierten *Enterobacteriaceae* wurden möglichst gut differenziert, um einen beispielhaften Überblick über die Art der bakteriellen Mikroflora der Arzneipflanzen zu bekommen.

Insgesamt wurden 1429 *Enterobacteriaceae*-Isolate von 249 Pflanzenproben gewonnen. Diese Isolate wurden zunächst im API ID32E-System differenziert. Danach ergaben sich 44 verschiedene *Enterobacteriaceae*, jedoch konnten 793 Isolate nur bis auf Gattungsebene identifiziert werden. 767 dieser Isolate erhielten die Bezeichnung „*Pantoea* spp.“. Zwecks näherer Charakterisierung wurden 997 Isolate einer weiteren Differenzierung im MicroLog 3.0-System unterzogen, darunter 506 „*Pantoea* spp.“. Während das API ID32E-System wie eine „klassische bunte Reihe“ mittels biochemischer Tests Stoffwechselprodukte in miniaturisierter Form anzeigt, wird bei MicroLog 3.0 die Reduktion verschiedener Kohlehydratquellen mittels eines Redox-Farbstoffes angezeigt (Handbuch MicroLog 3.0, Fa. Biolog). Die Reaktionen sind also nicht direkt miteinander vergleichbar. Es handelt sich bei MicroLog 3.0 um ein neues, für den „klassischen Mikrobiologen“ ungewohntes Prinzip. 137 Isolate konnten in MicroLog 3.0 nicht identifiziert werden, darunter 36 „*Pantoea* spp.“. Eine Clusteranalyse ermöglicht es in MicroLog 3.0, nicht identifizierte Isolate einer Gruppe zuzuordnen und ggf. mit weiteren gezielten Untersuchungen zu einer Gattungs- oder Speziesdifferenzierung zu kommen. Dass einige

Pflanzenisolate keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden konnten, hängt damit zusammen, dass die Taxonomie insbesondere in der pflanzentypischen *Erwinia-Enterobacter-Pantoea*-Gruppe noch nicht abgeschlossen ist. Aleksic und Bockemühl (1999) weisen darauf hin, dass Vertreter der sehr heterogenen Gattung *Erwinia* in den Datenbanken der kommerziellen Identifizierungssysteme nicht enthalten sind und häufig als *Pantoea agglomerans* identifiziert werden. In der Datenbank von MicroLog 3.0 ist zwar *Erwinia amylovora* enthalten, jedoch wurde keines der Isolate als solche identifiziert. Die internationale Nomenklaturliste enthält zur Zeit 16 *Erwinia*-Spezies sowie zusätzlich sechs *Pectobacterium*-Spezies, die zum Teil aus der Gattung *Erwinia* hervorgegangen sind. Die MicroLog 3.0-Datenbank enthält drei *Pectobacterium*-Spezies, von *Pectobacterium carotovorum* sind drei der zur Zeit bekannten sechs Subspezies enthalten. Die Gattung *Pectobacterium* ist in der API ID32E-Datenbank nicht enthalten. Es muß davon ausgegangen werden, dass sich unter den in API ID32E als *Pantoea* spp. bzw. in MicroLog 3.0 als *Pantoea agglomerans* identifizierten Isolaten einige befinden, die den Gattungen *Erwinia* oder *Pectobacterium* zuzuordnen sind. Vertreter beider Gattungen gehören zur epiphytischen Flora oder sind Verursacher von Fäulnis und anderen Pflanzenkrankheiten (Hauben et al. 1998, Aleksic und Bockemühl 1999). *Pantoea agglomerans* ist nach DNA-DNA-Hybridisierung aus einer Hybridisierungsgruppe verschiedener Isolate von *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola* und *Erwinia milletiae* hervorgegangen (Gavini et al. 1989). Die internationale Nomenklaturliste enthält zur Zeit 21 verschiedene *Pantoea*-Spezies, darunter eine *Pantoea agglomerans*-Typspezies mit drei Varianten, sowie zwei Subspezies von *Pantoea stewartii*. Zwölf *Pantoea*-Spezies haben bislang noch keinen eigenen Namen bekommen, sie werden mit Nummern bezeichnet (Tab. 20). Zu diesen taxonomisch unübersichtlichen Verhältnissen kommt hinzu, dass die Expression der in den Identifizierungssystemen genutzten Enzyme dieser Pflanzenisolate in einer Weise variabel sein kann, die mit dem derzeitigen Stand des Wissens nicht zu erfassen ist, da nicht immer bekannt ist, wodurch die Expression induziert wird. So ist es auch nicht verwunderlich, dass auch einige Isolate, die am Robert-Koch-Institut mit der offiziellen „bunten Reihe“ Bactid des CDC-Atlanta differenziert wurden, nicht identifiziert werden konnten. Doch auch der Versuch, solche Isolate molekularbiologisch zu identifizieren, schlägt gelegentlich fehl. So konnten Drancourt et al. (2000) *Enterobacter*- und *Pantoea*-Isolate aus der Umwelt und aus klinischen Materialien mittels 16S rDNA-Sequenzierung nicht bis auf Speziesebene identifizieren, weil die notwendigen Informationen in den Genbanken noch fehlen. Die beiden für die

Untersuchungen verwendeten Identifizierungssysteme haben beide Vor- und Nachteile, und es ist bei beiden Systemen zu offensichtlich unscharfen, gelegentlich sogar falschen Ergebnissen gekommen. Es kann jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die in API ID32E nur auf Gattungsebene und die in MicroLog 3.0 nicht identifizierten *Pantoea*-Isolate keiner obligat pathogenen Spezies angehören. Die obligat humanpathogenen Spezies werden in der Regel von den kommerziellen Identifizierungssystemen sicher erkannt. Der größte Teil der isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies hat sein Habitat auf Pflanzen und in der Umwelt. Fachbücher der (klinischen) Mikrobiologie geben für Vertreter der Gattungen *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella* und *Serratia* unter anderem Umwelt, Erdreich, Boden, Pflanzen und Wasser als natürliches Habitat an (Holmes und Aucken 1998, Abbott 1999, Aleksic und Bockemühl 1999, Janda und Abbot 1998). Einige Spezies werden im Darm und im oberen Respirationstrakt gesunder Menschen gefunden. Nur wenige Vertreter dieser Gattungen gelten als fakultativ pathogen, noch weniger als obligat pathogen. Schwere Infektionen mit umweltassoziierten *Enterobacteriaceae* betreffen in der Regel abwehrgeschwächte Patienten in Krankenhäusern. **Es gibt nach vertiefter Literaturrecherche keinen dokumentierten Fall, in dem eine solche Infektion auf die orale Einnahme pflanzlicher Arzneimittel zurückzuführen war** (Thiede und Beckmann, in Vorbereitung). Es ist zu bedenken, dass die Keimzahl bei Einnahme einer Tagesdosis eines pflanzlichen Arzneimittels äußerst gering wäre und auch bei abwehrgeschwächten Patienten unter der notwendigen Infektionsdosis für die jeweilige Spezies liegen dürfte.

### **Erläuterung zu einigen isolierten Bakteriengattungen und -arten**

Klebsiellen sind Erreger von eitrigen Lokalinfectionen und Sepsis. Atemwegsinfektionen wie Pneumonien entstehen nach aerogener Aufnahme der Erreger, häufig über kontaminierte Klimaanlage. Viele Klebsiellen-Infektionen entstehen endogen, wenn die Abwehr eines Trägers geschwächt wird. Zwischenfälle treten auf, wenn mit Klebsiellen kontaminierte Infusionen oder Blutkonserven verabreicht werden. Oft wird als Quelle erregertragendes Krankenhauspersonal identifiziert. *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* sind typische Hospitalismuserreger auf Intensivstationen und in onkologischen Abteilungen (Hahn und Bockemühl 2001). In den Proben wurden 14 von beiden Systemen als *Klebsiella oxytoca* identifizierte Isolate gefunden und keine eindeutig identifizierte

*Klebsiella pneumoniae*.

*Enterobacter*-Spezies zeigen ein ähnliches Krankheitsspektrum und ähnliche Infektionsquellen wie Klebsiellen. Auch hier sind besonders abwehrgeschwächte Patienten in Krankenhäusern von schweren Infektionen betroffen. Am häufigsten wurde *Enterobacter cloacae* isoliert, der wie andere *Enterobacter*-Spezies den Darmtrakt von Mensch und Tier besiedelt (Aleksic und Bockemühl 1999). *Enterobacter amnigenus*, der häufig von Baldrian isoliert wurde, ist ein typischer Pflanzenbesiedler und medizinisch bedeutungslos.

*Citrobacter freundii*, der zwölfmal mit beiden Systemen eindeutig identifiziert wurde, gilt als fakultativ pathogen und ist gelegentlich Ursache von Harnwegsinfektionen. Einige Stämme bilden Toxine, die Ursache einer Enteritis sein können. Solche Enteritiden sind selten und werden durch kontaminierte Lebensmittel hervorgerufen (Hahn und Bockemühl 2001, Tschäpe et al. 1995). Infektionen durch kontaminierte Arzneimittel sind nicht bekannt.

Auch *Pantoea agglomerans* wird gelegentlich aus klinischem Material isoliert, schwere Infektionen sind allerdings selten. Einige wenige Fälle von Synovitis oder Monoarthritis mit und ohne Sepsis waren immer auf eine Verletzung des betroffenen Gelenks durch den Stich eines Pflanzendorns oder durch einen Holzsplitter zurückzuführen (Flatauer und Khan 1978, Olenginski et al. 1991, deChamps et al. 2000).

*Escherichia coli* gehört zur Darmflora der Säugetiere und des Menschen. Auch bei nicht-organisch gedüngten Pflanzen ist eine geringe Kontamination mit *E. coli* durch Wildtiere zu erwarten. Solche *E. coli*-Stämme sind in der Regel nicht humanpathogen. Durch Objektträger-Serumagglutination lässt sich mit relativ geringem Aufwand eine potentielle Humanpathogenität abschätzen. Aus 49 der untersuchten 249 Pflanzenproben (19,7%) konnte *E. coli* isoliert werden, obwohl die Anbauflächen nach Aussage der Anbauer seit mindestens zwei Jahren nicht organisch gedüngt waren. Nach Serumagglutination waren unter 81 *E. coli*-Isolaten lediglich 3 zu finden, die mit den polyvalenten Seren gegen potentiell humanpathogene *E. coli* reagierten. Nach der Serotypisierung im Hygiene Institut Hamburg, Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger, stellte sich heraus, dass zwei dieser Isolate, die von derselben Pflanzenprobe stammten, zur Gruppe O107 gehörten. Antikörper gegen diese Gruppe sind in den bei L+S verwendeten polyvalenten Seren nicht enthalten, doch es ist nicht

ungewöhnlich, dass es zwischen verschiedenen O-Gruppen zu Kreuzreaktionen kommt. Ein Vertreter der Gruppe O107 ist als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) identifiziert worden. Bei einem Nachweis von *E. coli* sollte also eine Serotypisierung durchgeführt werden, die wenig aufwendig ist. Werden Vertreter potentiell humanpathogener O-Gruppen gefunden, so kann über eine gezielte Untersuchung auf Pathogenitätsfaktoren entschieden werden. Da die Infektionsdosis für EHEC bei  $<10^2$  KBE liegt, also unter dem für die Kategorie 4A geforderten Maximalwert, sollte im Fall der gefundenen O107 also ein Shigatoxin-Nachweis mittels ELISA oder ein Nachweis des entsprechenden Gens bzw. der Gene mittels PCR geführt werden.

Auf eine Auswertung der Kombination verschiedener *Enterobacteriaceae*-Spezies auf den drei Pflanzenarten wurde verzichtet. Um wissenschaftlich haltbare Aussagen hinsichtlich Bakterienpopulationen machen zu können, sind sehr viel genauere Untersuchungen notwendig. Neben Kultivierungsmethoden, die ein noch breiteres Bakterienspektrum sicher erfassen, und molekularbiologischen Untersuchungen zur Identifizierung der Isolate wären sicherlich auch aufwendige histologische Untersuchungen notwendig, da davon auszugehen ist, dass nur ein Teil der Mikroorganismen eines „Biofilms“ kultivierbar ist. Etwa die Hälfte der *Enterobacteriaceae*-Isolate wurde von API ID32E als „*Pantoea* spp.“ identifiziert und gehörten somit zur schwer identifizierbaren Gruppe der Pflanzenbesiedler. Von vielen Spezies wurden nur einzelne oder einige wenige Isolate erhalten, was nicht auf regelmäßige Besiedlung hinweist. Möglicherweise sind einzelne Pflanzenteile bzw. -abschnitte unterschiedlich besiedelt.

Es wurde kein Hinweis auf obligat humanpathogene *Enterobacteriaceae* in großer Zahl auf nicht organisch gedüngten Arzneipflanzen gefunden. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass Kontaminationen während der Ernte und Verarbeitung Ursache für die hohen Keimzahlen sind. Im Lebensmittelbereich werden *Enterobacteriaceae* bei Kräutern und Gewürzen nicht geregelt. Außer von der Pharm. Eur. wird eine Maßregelung von *Enterobacteriaceae* international von keinem anderen Arzneibuch gefordert, auch nicht von der USP.

Deshalb schlagen wir folgende Änderung des Keimzahllimits im Europäischen Arzneibuch  
vor **geschlagen**:

<b>Keime</b>	<b>Keimzahl</b>
Aerob mesophile Keimzahl	$1,0 \times 10^8$ KBE/g (ml)
Hefen	$1,0 \times 10^6$ KBE/g (ml)
Schimmelpilze	$1,0 \times 10^5$ KBE/g (ml)
<i>E. coli</i>	$1,0 \times 10^4$ KBE/g (ml), jedoch bei Nachweis Überprüfung auf mögliche Pathogenitätsfaktoren
Salmonellen	abwesend in 5 x 25g
Enterobakterien	nicht maßregeln!!



Earhardt CF: Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In: Neidhardt F C (Ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Washington D. C.: ASM Press, 1996: 1075-1090.

Farmer III JJ: *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds) *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D. C.: ASM Press; 1999: 442ff.

Flatauer FE und Khan MA: Septic arthritis caused by *Enterobacter agglomerans*. *Arch Intern Med* 1978; 138: 788

Frank B: Mikroorganismen in Drogen. *Dtsch Apoth Ztg* 1989; 129: 617-623.

Friedrich H, Schneider D: Untersuchungen über den mikrobiologischen Status von *Fructus Sennae* TV des Handels. *Dtsch Apoth Ztg* 1975; 115: 1463.

Gavini F, Mergaert J, Beji A, Mielcarek C, Izard D, Kersters K: Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 337-345.

Gibson F, Magrath DI: The isolation and characterization of a hydroxamic acid (Aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Acta* 1969; 192: 175-184.

Graf E, Scheer R: Keimzahlverminderung in Drogen und Hilfsstoffen. *Pharm Ind* 1980; 42: 732-744.

Haberer K: Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Nachweis spezifizierter Mikroorganismen. In: Hartke K, Hartke H, Mutschler E., Rücker G Wichtl M (Hrsg.): *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch*, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft/ Eschborn: Govie-Verlag – Pharmazeutischer Verlag GmbH; 1999; 2.6.13: 1-5.

Härtling C: Beitrag zur Frage des mikrobiellen Zustandes pflanzlicher Drogen - Fakten und Folgerungen. Pharm Ztg 1987; 132: 643-644.

Hahn H, Bockemühl J: Enterobakterien. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (Hrsg) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; 2001: 250-287.

Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J: Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Syst Appl Microbiol 1998; 21: 384-397.

Holmes B, Aucken HM: *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia* and other Members of the *Enterobacteriaceae*. In: Balows A, Duerden BI (Eds) Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Volume 2 Systematic Bacteriology. London: Arnold; 1998: 1001ff.

Janda JM, Abbot SL: The Enterobacteria. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

Kabelitz L: Mikrobiologische Belastungen an Heil- und Gewürzpflanzendrogen. Arznei- und Gewürzpflanzen 1996; 1: 9-16.

Kneifel W, Berger E: Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. J Food Protection 1994; 57: 893-901.

Kolb N: Microbiological status of untreated herbal materials. Dtsch Lebensmittelrundschau 1999; 95: 263-269.

Leimbeck R: Teedrogen - Wie steht es mit der mikrobiologischen Qualität? Dtsch Apoth Ztg 1987; 127: 1221-1226.

Litwin DM, Calderwood SB: Role of iron in regulation of virulence genes. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 137-149.

Neilands JB: Evolution of biological iron binding centers. Struct Bond 1972; 11: 145-170.

Olenginski TP, Bush DC, Harrington TM. Plant thorn synovitis: an uncommon cause of monoarthritis. Semin Arthritis Rheum 1991; 21: 40-46.

Reissbrodt R: Iron and micro-organisms. Culture 1994; 15: 5-8.

Schilcher H: Rückstände und Verunreinigungen bei Drogen und Drogenzubereitungen. 19. Mitteilung: Zur Wertbestimmung und Qualitätsprüfung von Drogen. Planta Medica 1982; 44: 65-77.

Schneider E: Keimbesiedlung von frischen Arzneipflanzen und Drogen. Dtsch Apoth Ztg 1987; 127: 1683-1686.

Singleton P: Einführung in die Bakteriologie. Wiesbaden: Quelle und Meyer Verlag, 1995: 269-271.

Tschäpe H, Prager R, Streckel W, Fruth A, Tietze E, Böhme G: Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. Epidemiol Infect 1995; 114: 441-450.

Wallhäußer KH: Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung. Keimidentifizierungen - Betriebshygiene. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1995.

## 9. Anhang

### Enterobacteriaceae-Spezies der Datenbanken der beiden verwendeten Systeme

Enterobacteriaceae in MicroLog 3.0	Enterobacteriaceae in API ID32E
<i>Brenneria rubrifaciens</i>	
<i>Brenneria salicis</i>	
<i>Budvicia aquatica</i>	<i>Budvicia aquatica</i>
<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Buttiauxella agrestis</i>
<i>Buttiauxella brennererae</i>	
<i>Buttiauxella ferragutiae</i>	
<i>Buttiauxella gaviniae</i>	
<i>Buttiauxella izardii</i>	
<i>Buttiauxella noackiae</i>	
<i>Buttiauxella warmboldiae</i>	
<i>Cedecea davisae</i>	<i>Cedecea davisae</i>
<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Cedecea lapagei</i>
<i>Cedecea neteri</i>	<i>Cedecea neteri</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Citrobacter amalonaticus/farmeri</i>
<i>Citrobacter braakii</i>	
<i>Citrobacter farmeri</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii group</i>
<i>Citrobacter gillenbergii</i>	
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter koseri</i>
<i>Citrobacter murliniae</i>	
<i>Citrobacter rodentium</i>	
<i>Citrobacter sedlakii</i>	
<i>Citrobacter werkmanii</i>	
<i>Citrobacter youngae</i>	
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	<i>Edwardsiella hoshinae</i>
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Enterobacter aerogenes (Kleb. Mobilis)</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Enterobacter agglomerans bgp 2</i>	
<i>Enterobacter agglomerans bgp 3</i>	
<i>Enterobacter agglomerans bgp 4 (Pantoea)</i>	
<i>Enterobacter agglomerans bgp 5</i>	
<i>Enterobacter agglomerans bgp 6 (Pectobacterium)</i>	
<i>Enterobacter agglomerans bgp 7 (Pantoea)</i>	
<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i>	
<i>Enterobacter intermedius</i>	<i>Enterobacter intermedius</i>
<i>Enterobacter nimipressualis</i>	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	
<i>Escherichia blattae</i>	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli (USP5-7085)</i>	

<i>Escherichia coli</i> O157:H7	
<i>Escherichia coli</i> inactive	
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>
<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Escherichia hermannii</i>
<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia vulneris</i>
<i>Ewingella americana</i>	<i>Ewingella americana</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella planticola</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss ozaenae	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss ozaenae
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss pneumoniae	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss pneumoniae
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss rhinoscleromatis	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss rhinoscleromatis
	<i>Klebsiella terrigena</i>
<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>
<i>Kluyvera cochleae</i>	
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
<i>Kluyvera georgiana</i>	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
<i>Leminorella grimontii</i>	
<i>Leminorella richardii</i>	
<i>Moellerella wisconsensis</i>	<i>Moellerella wisconsensis</i>
<i>Morganella morganii</i> ss morganii	<i>Morganella morganii</i>
<i>Obesumbacterium proteus</i>	
<i>Obesumbacterium proteus</i> biogroup 2	
	<i>Pantoea</i> spp. 1
	<i>Pantoea</i> spp. 2
	<i>Pantoea</i> spp. 3
	<i>Pantoea</i> spp. 4
<i>Pantoea agglomerans</i>	
<i>Pantoea citrea</i>	
<i>Pantoea dispersa</i>	
<i>Pantoea punctata</i>	
<i>Pantoea stewartii</i> ss stewartii	
<i>Pantoea terrea</i>	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> ss atrosepticum	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> ss betavasculorum	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> ss carotovorum	
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	
<i>Pectobacterium cypripedii</i>	
<i>Photorhabdus luminescens</i> ss luminescens	
<i>Pragia fontium</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Proteus myxofaciens</i>	
<i>Proteus penneri</i> /vulgaris	<i>Proteus penneri</i>
	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Providencia heimbachae</i>	
<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Providencia rustigianii</i>	<i>Providencia rustigianii</i>
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Raoultella planticola</i>	

<i>Raoultella planticola/ornithinolytica</i>	
<i>Raoultella terrigena</i>	
<i>Salmonella</i> gp 1 (choleraesuis)	<i>Salmonella</i> spp.
<i>Salmonella</i> gp 1 (choleraesuis) ST choleraesuis	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Salmonella</i> gp 1 (choleraesuis) ST gallinarum	
<i>Salmonella</i> gp 1 (choleraesuis) ST paratyphi A	<i>Salmonella paratyphi</i> A
<i>Salmonella</i> gp 1 (choleraesuis) ST pullorum	
<i>Salmonella</i> gp 1 (choleraesuis) ST typhi	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Salmonella</i> gp 1 (choleraesuis) ST typhimurium	
<i>Salmonella</i> gp 3A (arizonae)	<i>Salmonella arizonae</i>
<i>Salmonella</i> gp 3B (diarizonae)	
<i>Salmonella</i> gp 4 (houtenae)	
<i>Salmonella</i> gp 5 (bongori)	
<i>Salmonella</i> gp 6 (indica)	
<i>Serratia entomophila</i>	
<i>Serratia ficaria</i>	<i>Serratia ficaria</i>
<i>Serratia fonticola</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>Serratia liquefaciens/grimesii</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Serratia odorifera</i>	<i>Serratia odorifera</i>
<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Serratia proteamaculans</i> ss <i>proteamaculans</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>
<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
	<i>Shigella</i> spp. 1
	<i>Shigella</i> spp. 2
	<i>Shigella</i> spp. 3
<i>Shigella boydii</i>	
<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>Shigella flexneri</i>	
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Tatumella ptyseos</i>	
<i>Trabulsiella guamensis</i>	
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	
<i>Yersinia aldovae</i>	
<i>Yersinia bercovieri</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i> ss <i>enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Yersinia fredericksonii</i>	<i>Yersinia fredericksonii</i>
<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Yersinia kristensenii</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>
<i>Yersinia mollaretii</i>	
<i>Yersinia pestis</i>	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Yersinia rohdei</i>	
<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
<i>Yokenella regensburgei</i>	