universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Hygienestatus und mikrobiologische Sicherheit von Kräutern zur Verwendung in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM)

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Birgit Ortner
Matrikel-Nummer:	A 9208828
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Biologie (Genetik/ Mikrobiologie)
Betreuerin / Betreuer:	ao. Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Angela Witte
	o. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Wolfgang Kneifel

Wien, im Dezember 2008

Danksagung

Ich möchte mich bei Fr. Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Angela Witte, bei Hr. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Wolfgang Kneifel und bei Hr. Univ.-Ass. Dipl.-Ing. Dr. Konrad Domig für die Vorgabe des Themas, für die Betreuung und für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.
Hr. Univ.-Ass. Dipl.-Ing. Dr. Konrad Domig möchte ich einen speziellen Dank aussprechen für seine fachliche Betreuung und seine Unterstützung während der Durchführung meiner Arbeit.
Weiters möchte ich mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern der Abteilung Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene für ihr amikales und hilfsbereites Verhalten mir gegenüber bedanken.

Mein ganzer Herzensdank gilt meiner geliebten Familie, meinen Eltern und meinem Bruder, die mir mit unendlicher Liebe bei all meinen Taten Rückhalt, Kraft und Stärke geben und immer an mich glauben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung……………………………………………………………………….……..5

1.1. Entwicklung TCM……………………………………….……………….............5

1.2. Kräuterheilkunde……………………………………………………….......................8

1.3. Natürliche Mikroflora der Pflanzen………………………………….……….…....10

1.4. Analyse der pflanzlichen Arzneistoffe……………………………………………..11

1.4.1. Grundlagen zu den mikrobiologischen Parametern………………….…………..11

1.4.2. Grundlagen zu den molekularbiologischen Parametern…………..……………15

2. Material und Methoden…………………………………………………..………...19

2.1. Probenspektrum……………………………………………………….……………19

2.2. Mikrobiologische Methoden……………………………….................................50

2.3. Molekularbiologische Methoden……………………………………………………55

2.3.1. DNA-Isolierung…………………………………………………………………….55

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion………………………………………………………57

2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese…………………………………………………...59

3. Ergebnisse………………………………………………………………………….61

3.1. Mikrobiologische Ergebnisse………………………………………………………61

3.1.1. Ergebnisse bezogen auf mikrobiologische Parameter…………………………..63

3.1.2. Ergebnisse bezogen auf die Art der Arzneipflanzen……………………………..77

3.1.3. Ergebnisse bezogen auf die Bezugsquelle der Arzneipflanzen……….…..….81

3.2.Molekularbiologische Ergebnisse…………………………………….……………..…86

3.2.1. Molekularbiologische Ergebnisse der aus China bezogenen Proben……..…86

3.2.1.1. Detektion von *Bacillus cereus*-DNA (PARK, 2007)…………………..….86

3.2.1.2. Detektion von DNA der *Bacillus cereus* Gruppe (PARK, 2007).….…..89

3.2.1.3. Detektion von DNA der *Bacillus cereus* Gruppe (CHANG, 2003)….….92

3.2.1.4..Detektion von *Bacillus cereus*-DNA (YAMADA, 1999)………..……95

3.2.2. Molekularbiologische Ergebnisse der aus Österreich bezogenen Proben…....97

3.2.2.1. Detektion von DNA der *Bacillus cereus* Gruppe und *Bacillus cereus*...97

4. Diskussion…………………………..……………………………………………98

5. Zusammenfassung……………………………………………………………..106

6. Abstract……107

7. Auflistung der Rohdaten……108

8. Abbildungsverzeichnis ……113

9. Tabellenverzeichnis ……117

10. Abkürzungsverzeichnis……118

11. Literaturverzeichnis ……120

12. Curriculum vitae……128

1. Einleitung

1.1. Entwicklung der TCM

Die traditionelle chinesische Medizin (TCM) ist aus heutiger Sicht im Prinzip eine Synthese aus verschiedenen Strömungen und Traditionen, die auf der eklektischen Sicht der alten Weisen Chinas beruht. Die Entwicklung ging von einer zentralchinesischen Volksheilkunst aus, in die einzelne Strömungen von taoistischen und konfuzianischen Philosophien einwirkten. Es wurden aus verschiedensten Theorien die sinnvollsten Konzepte ausgewählt, systematisiert und miteinander verbunden (FOCKS et al., 2006; LEUNG, 1993).

Der Ursprung der TCM geht in die „Frühlings-und Herbst"-Periode (710-475 v. Chr.) und in die „Periode der streitenden Reiche" (475-221 v. Chr.) der chinesischen Kulturgeschichte zurück. In diesem Zeitraum entstand die chinesische Medizin unter dem konfuzianischen und taoistischen Einfluss der Fünf-Elemente-Schule (Metall, Wasser, Holz, Erde, Feuer) und der Yin-(negative Kräfte) und Yangtheorie (positive Kräfte). Auch weitere philosophische Konzepte wie Mikrokosmos-Makrokosmos, das Mittelmass und das Leben mit und im Fluss der Natur wirkten prägend auf die Entwicklung (Anonymus, 2006).
Es existieren schriftliche Aufzeichnungen zu medizinischen Themen und philosophischen Denkens, in denen die wichtigsten Regeln und Erfahrungen, die bis heute gültig sind, festgelegt sind.
Ungefähr 300 v. Chr. entstand das größte medizinische Werk „Huang Di Nei Jing" (Klassiker von der Inneren Medizin des gelben Kaisers), in welchem die Wichtigkeit des Tao, des Weges, also des Harmonieprinzips verdeutlicht wird und zum ersten Mal die theoretischen Grundlagen der chinesischen Medizin beschrieben werden (HECKER et al., 2006).

Zur Zeit der Östlichen Han-Dynastie (205-220 n. Chr.) wurden zu den im Werk „Huang Di Nei Jing“ aufgestellten Theorien Erfahrungen gesammelt und eine Verbindung von Theorie und Praxis hergestellt. Der Arzt Zhang Zhong Jing schrieb auf dieser Grundlage das bedeutende Werk „Shang Han Za Bing Lun“ (Das Buch über Kälteschaden und anderen Krankheiten), indem er die Gesetzmäßigkeit der Therapeutik darlegte. Es stellt den Beginn der Kräutertherapie und der systematischen Rezepturkunde dar und wurde zum Standardwerk für die chinesische Arzneimitteltherapie (Anonymus, 2006).

Ein weiterer Klassiker entstand in der späten Han-Dynastie, „Shen Nong Ben Cao Jing“ (Materia Medica des Gottes des Ackerbaus). Dieses Buch widmet sich ausschließlich der Arzneimitteltherapie und gilt als Grundlagenwerk der Arzneimittellehre. In diesen schriftlichen Aufzeichnungen werden bereits 365 Arzneien, davon 252 pflanzliche Produkte beschrieben. Diese sind in drei verschiedene Klassen (je nach Anwendungsgebiet in obere, mittlere und tiefe Arzneien) eingeteilt und sind nach Temperatur und Geschmack klassifiziert (HECKER et al., 2006; ZHU, 1998; LIAO, 2006).

Eine Überarbeitung dieser klassischen Materia Medica erfolgte 659 n. Chr. von der chinesischen Regierung und wurde als „Xin Xiu Ben Cao“ (Neue überarbeitete Materia Media) herausgegeben. Dieses Werk gilt als erste offizielle Pharmakopoe in China (ZHU, 1998). Darin sind in 25 Bänden 844 verschiedene Arzneipflanzen illustriert (HOU et. al., 2005).

In der weiteren Entwicklungsperiode zur Zeit der Jin-und Yuan-Dynastie (1115-1368 n. Chr.) wurden von verschiedenen Aspekten ausgehend die Hauptursachen der damals erkannten Krankheiten und das Grundprinzip ihrer Behandlung interpretiert. Wesentliche Einflüsse kamen von der arabischen und der mongolisch-tibetischen Medizin. Die Erfahrungen der Ärzte Liu He Jan, Zhang Zi He, Li Dong Huan und Zhu Dan Xi (Gründer berühmter TCM-Schulen) trugen weitreichend zur Entwicklung der traditionellen medizinischen Medizin bei (FOCKS et. al., 2006). Deren Schriften werden heute noch als grundlegend in der Behandlung von neuzeitlichen Krankheiten angesehen (Anonymus, 2006).

Zur Zeit der Ming-und Qing-Dynastie (1368-1911 n. Chr.) wurden aufgrund des Auftretens vieler Seuchen zunehmend akute febrile Erkrankungen analysiert (FOCKS et. al., 2006). Die Lehre der „warmen“ (akuten) Krankheiten wurde gegründet und Theorien zur Behandlung dieser Krankheiten durch Analyse der Symptome

aufgestellt. Aus dieser Zeit stammen die Werke „Zhen Jiu Da Cheng“ (Das große Buch der Akupunktur) und „Ben Cao Gang Mu“ (Materia Medica), eine der größten systematischen Sammlung landesweit verwendeter Arzneien mit beinahe 2000 beschriebenen und klassifizierten Arzneimitteln (FOCKS et. al., 2006; Anonymus, 2006; ZHU, 1998).
Nach der Gründung der Republik China 1911 kam es zur Ausrichtung des Gedankenguts auf Wissenschaftlichkeit und westliche Methodik. Während des Guomindang Regimes (1912-1949) kam es zum Versuch die traditionelle Form der Medizin zu verbieten. Das Verbot wurde jedoch nach vehementen Protesten der TCM-Schulen und der traditionellen Ärzte fallen gelassen. Nach der Machtübernahme der Kommunisten in der Volksrepublik China erlebte die traditionelle chinesische Medizin einen neuen Aufschwung. Es kam zu Umstrukturierungen und zur Gründung von universitären Lehrgängen (FOCKS et. al., 2006).

Die weltweite Verbreitung der TCM ging von den im Laufe der Zeit in China gegründeten Hochschulen aus. Die ersten Berichte über die Heilkunde in West-und Zentralasien gehen ins 13. Jahrhundert zurück. Weitere naturheilkundliche Berichte folgten durch Marco Polo`s Asienreisen (1254- 1324) und ab 1550 durch christliche Missionare. Dann, zu Beginn des 17. Jahrhunderts, wurde von der Kirche untersagt, sich mit ostasiatischen Heilmethoden zu beschäftigen. Weitere Berichte über die chinesische Medizin erfolgten erst wieder gegen Ende des 17. Jahrhunderts von Ärzten der niederländischen Ostindiengesellschaft, wobei das Interesse und die überlieferten Informationen anfänglich auf den Bereich der Akupunktur beschränkt waren (HECKER, 2003).
Erst später weiteten sich die westlichen Kenntnisse auf die therapeutischen, medizinischen und diagnostischen Gebiete der TCM, wie Massagen (Tuina), Atemtherapien (Qi-Gong), Gymnastik-und Bewegungsübungen (Ttai ji quan) aus.
Seit den 1970er Jahren fand die TCM dann zunehmendes Interesse im westlichen Kulturkreis. Umfassende Darstellungen in westlichen Sprachen trugen wesentlich zu Verbreitung der traditionellen chinesischen Medizin in Europa bei.

1.2. Kräuterheilkunde

Die traditionelle chinesische Medizin umfasst fünf Teilbereiche:

- Arzneitherapie (Kräuterheilkunde)
- Akupunktur und Moxibustion (ist das Abbrennen von Brennkegeln auf der Haut an bestimmten Akupunkturpunkten)
- Ernährungslehre
- Tuina (Massage)
- Qi Gong (sind Bewegungsübungen, verbunden mit bestimmten Atem- und Meditationstechniken)

Die Kräuterheilkunde ist ein wichtiges Teilgebiet der TCM. In der chinesischen Kräutertherapie werden zu 95% pflanzliche, aber auch tierische und mineralische Ingredienzien verwendet. Es wird eine Vielzahl von Drogen zur inneren und äußeren Anwendung eingesetzt. Der Begriff Droge wird im pharmazeutischen Sprachgebrauch für alle Arten von aus der Natur stammenden Arzneien gebraucht und steht für Produkte aus Wurzeln, Blättern, Früchten und Kräutern, ebenso auch für tierische und mineralische Produkte (WU, 2005).
In Europa beschränkt sich die chinesische Arzneitherapie auf die Phytotherapie, das heißt die Verwendung rein pflanzlicher Wirkstoffe als Arzneimittel.
Die offizielle Definition für pflanzliche Arzneimittel gemäß der EU-Richtlinie 24/ 2004/ EG lautet: „Pflanzliche Arzneimittel sind alle Arzneimittel, die als Wirkstoff(e) ausschließlich einen oder mehrere pflanzliche Stoffe enthalten“, sie können auch eine oder mehrere pflanzliche Zubereitungen enthalten oder auch Kombinationen mehrerer pflanzlicher Stoffe oder pflanzlicher Zubereitungen sein.
Durch die botanische Bezeichnung der Pflanze und der verwendeten Pflanzenteile sind pflanzliche Stoffe eindeutig nach dem Internationalen Code der Botanischen Nomenklatur (ICBN) definiert. Durch den Zusatz des verwendeten Pflanzenteils und der entsprechenden Züchtung, Sorte oder Unterart, ist das verwendete Ausgangsmaterial eindeutig charakterisiert.

In der TCM werden über 5000 Pflanzenarten als pflanzliche Drogen verwendet. Jede Einzeldroge besitzt ihr spezifisches Profil bestehend aus dem Temperaturverhalten (kühlend, kalt, warm, heiß) und der Geschmacksqualität (sauer, bitter, süß, salzig, neutral). Diese elementaren Eigenschaften jeder Arzneipflanze stehen im direkten Zusammenhang mit bestimmten Wirktendenzen, dem therapeutischen Effekt und der Organspezifität (HOU et. al., 2005).

Pflanzliche Arzneimittel werden aus Heilpflanzen bzw. aus Teilen daraus hergestellt. Frische Pflanzen müssen einer Vorbehandlung unterzogen werden um die erforderlichen Kriterien für Stabilität, Reinheit, Haltbarkeit, Lagerungsfähigkeit und Transport zu erfüllen. Die Pflanzen werden nach der Ernte sortiert und gewaschen. Dabei werden grobe oberflächliche Verunreinigungen, unbrauchbare, toxische und medizinisch nicht verwendbare Pflanzenteile entfernt und eventuell vorhandene unterschiedlich wirksame Teile einer Pflanze voneinander getrennt. Danach werden die sortierten Pflanzen grob zerkleinert und entweder in direktem Sonnenlicht im Freien oder bei stark aromatischen Pflanzen auf gut belüfteten Schattenflächen getrocknet. Im weiteren Behandlungsschritt werden die Heilkräuter zerkleinert, zermahlen oder zerrieben und für den Transport verpackt (HOU et al., 2005).
Es gibt auch spezielle anschließende Verarbeitungsverfahren, wie Trockenrösten, Backen oder Schmoren mit Wein, Salz, Ingwersaft, Honig oder Essig. Diese Spezialverfahren werden durchgeführt um die therapeutischen Wirkeigenschaften der Pflanze zu modifizieren, eventuell vorhandene Toxizität oder schlecht schmeckenden Geschmack aus der Pflanze zu eliminieren (LEUNG et al., 2006; HOU et al., 2005).

Die Verabreichung der Heilpflanzen erfolgt auf vielen verschiedenen Varianten. Selten werden Arzneipflanzen einzeln verwendet, meist werden mehrere zu einer Verordnung zusammengestellt. In einer sogenannten „Rezeptur“ sind in der Regel zwischen zwei und zwölf verschiedene, optimal aufeinander abgestimmte Heilkräuter angeführt (LEUNG et al., 2006).
Die traditionelle und meist verbreitete Anwendungsform ist die Methode der Abkochung (Dekoktion). Dabei werden die getrockneten Wurzeln, Samen, Blätter, Früchte und Zweige für 30 bis 45 Minuten mit Wasser zweimal abgekocht und anschließend filtriert. Der dunkle Extrakt (Dekokt) wird für innere und äußere

Anwendungen verwendet. Auch die Zubereitung von Tee ist eine einfache und häufige Art der Verabreichung. Moderne Formen der chinesischen Phytotherapie sind Tabletten, Granula, Kapseln oder Pillen zur oralen Anwendung, sowie Tinkturen und Kräuterpflaster, die äußerlich angewendet werden (LEUNG et al., 2006; HOU et al., 2005).

1.3. Natürliche Mikroflora der Pflanzen

Aufgrund der jährlich steigenden Nachfrage betreffend der traditionellen Heilmethoden der traditionellen chinesischen Medizin als Alternative bzw. Ergänzung zur klassischen westlichen Schulmedizin erscheint es sinnvoll, mehr Informationen über das Ausmaß und Art der mikrobiellen Belastung und deren Hygienestatus zu erlangen.
Ziel dieser Arbeit ist es, den mikrobiellen Status von Arzneipflanzen, die in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet werden, zu erfassen.

Grundsätzlich ist dabei zu bedenken, dass pflanzliche Drogen ein großes Spektrum an „natürlichen“ Mikroorganismen beherbergen. Diese Tatsache wird durch mehrere Faktoren begründet und hat einen großen Einfluss auf den mikrobiellen Status der medizinisch verwendeten Pflanzen (KNEIFEL et al., 2002).
Die Keimbelastung der Arzneipflanzen wird beeinflusst durch die Bodennähe der Pflanze und deren Mikroklima (ANDREWS et al., 1980). Weiters ergaben elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass die anatomische Feinstruktur der Pflanze einen entscheidenden Einfluss auf den „natürlichen“ Keimgehalt von Pflanzen hat. Pflanzen mit Härchen, Trichomen oder größeren rauen Oberflächen sind wesentlich stärker kontaminiert als solche mit kleinen, glatten Oberflächen (ALONZO et al., 1994; BECKMANN et al. 1996). Einen weiteren Faktor stellt die Physiologie des Blattes dar, welcher die Zusammensetzung und Populationsgröße der Mikroflora durch Kohlenhydrate, die auf den Blättern der Arzneipflanze verfügbar sind, beeinflusst (MERCIER et al., 2000). Auf verschiedenen Pflanzenteilen befinden sich fest haftende Biofilme, in denen die verschiedensten Bakterienarten miteinander kommunizieren und interagieren (MORRIS et al., 1997; FETT, 2000).

Neben diesen Pflanzeneigenschaften und dem daraus resultierenden „natürlichen“ Mikroorganismeneintrag vor der Ernte, spielen auch Vektoren wie Kriechtiere, Kleinsäuger, Vögel und Arthropoden als Überträger von Mikroorganismen auf die Pflanze während Ernte, Lagerung, Transport, Trocknung und Verarbeitung eine bedeutende Rolle (BECKMANN et al., 2003).
Es ist daher verständlich, dass medizinisch verwendete Pflanzen bzw. Pflanzenteile nicht steril sein können und eine mikrobiologische Belastung unvermeidlich ist.

1.4. Analyse der pflanzlichen Arzneistoffe

1.4.1. Grundlagen zu den mikrobiologischen Parametern

In Anlehnung an die Europäische Pharmacopoe 2007 und European Herbal Infusion Association (EHIA) 2008 wurden folgende mikrobiologische Parameter für die Untersuchung der Proben gewählt: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, Hefe- und Schimmelpilze, Enterobakterien, Enterokokken, Laktobazillen, koagulase positive Staphylokokken, anaerobe und aerobe Sporenbildner. Die Mikroorganismenkultivierung und Identifizierung wurden unter Berücksichtigung von entsprechenden ISO-Normen durchgeführt (siehe Kapitel 2.2. Mikrobiologische Methoden).

Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl
Das Verfahren der quantitativen Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl dient als üblicher Hygiene-Parameter bei der Untersuchung von Kräutern und stellt die Gesamtkeimbelastung pro Gramm Probe dar. Zu den aeroben mesophilen Keimen gehören Bakterien, Schimmelpilze und Hefen, die unter den in diesem Verfahren definierten Bedingungen Kolonien bilden.

Wie schon im vorangegangenen Kapitel “Natürliche Mikroflora der Pflanzen“ erwähnt, stellt der Parameter der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl ein Resultat vieler Einflussgrößen dar und hat deshalb bei der Beurteilung von Kräutern eine begrenzte

Aussagekraft. Es sollte eine Auswertung in Abhängigkeit von der Art der Droge (Blatt, Frucht, Blüte, Wurzel, Ast) durchgeführt werden (BECKMANN et.al., 1996).
Weitere kritische Anmerkungen hinsichtlich der Aussagekraft dieses Parameters sind nachfolgende: Hohe Keimzahlen gelten sicherlich als hygienisch bedenklich oder geben Hinweis auf mangelhafte Ernte-, Trocknungs- und Verarbeitungshygiene. Umgekehrt stehen aber niedrige Gesamtkeimzahlen nicht unbedingt für eine befriedigende mikrobiologisch-hygienische Qualität. Dies kann erst durch den Nachweis der Abwesenheit von pathogenen und toxinogenen Keimen verifiziert werden (BECKMANN et.al., 1996).

Hefe- und Schimmelpilze

Hefen sind einzellige Pilze, von denen die meisten zu den Ascomyceten gehören. Hefezellen sind meist kugelförmig, oval und die Zellteilung erfolgt im Allgemeinen durch Knospung.
Schimmelpilze sind filamentöse Pilze, deren Hyphen ein leicht erkennbares Mycel bilden.
Hefen und Schimmelpilze kommen auf Pflanzen, Erdboden, Lebensmitteln, Tieren und auf der Haut vor. Sie sind bedeutend bei der Herstellung von Lebensmitteln und deren Verderb. Einige Hefen sind humanpathogen, zahlreiche Schimmelpilze produzieren Mykotoxine (MADIGAN et. al., 2001).
Ein gleichzeitiger Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen auf einem Nährmedium wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist aufgrund der unterschiedlichen Koloniemorphologie möglich.

Enterobakterien

Enterobakterien gehören zur Gamma-Gruppe der Proteobakterien und sind gram-negative, fakultativ aerobe, nicht sporulierende Stäbchen. Sie sind unbeweglich oder beweglich durch peritriche Geißeln, Oxidase-negativ mit relativ einfachen Nährstoffanforderungen und vergären Zucker zu einer Vielfalt von Endprodukten (MADIGAN et. al., 2001).
Der Nachweis von Enterobakterien gilt als allgemeiner Hygiene- und Qualitätsparameter (Europäische Pharmakopoe, 2008) und als Indikator für eine Kontamination aus einer feuchten Umgebung mit organischer Verunreinigung (HABERER, 1999).

Es gibt jedoch viele Vertreter dieser taxonomischen Familie, die im Hinblick auf den Hygienestatus von Kräutern und Arzneipflanzen keine Aussagekraft haben.
Für viele Gattungen der Familie der *Enterobacteriaceae* gelten Umwelt, Erdreich, Pflanzen und Wasser als natürliches Habitat und können gewissermaßen als pflanzenphysiologisch bewertet werden (BECKMANN et. al., 1996; KNEIFEL et. al., 2002). Auf Pflanzen dominieren Vertreter der Pantoea-Enterobacter-Erwinia-Gruppe, die zur natürlichen pflanzenassoziierten Mikroflora gehören (THIEDE et. al., 2002).

Enterokokken

Enterokokken sind gram-positive, Katalase-negative, fakultativ anaerobe kugelförmige Bakterien, die in Paaren oder kurzen Ketten angeordnet sind (MADIGAN et. al., 2001). Sie sind wichtige Mikroorganismen im Verdauungssystem und bilden den überwiegenden Anteil der aeroben gram-positiven Kokken der Darmflora von Mensch und Tier (MAKI et. al., 1998). Enterokokken kommen auch in Lebensmitteln, Wasser, Abwässern, Futtermitteln, Staub und auf Pflanzen vor (MURRAY, 1990; MÜLLER et. al., 2001; KNEIFEL et. al., 2002).
In der Wurst- und Käsereitechnologie spielen Enterokokken als sogenannte Starter- oder Schutzkulturen eine wichtige Rolle bei Fermentations-und Reifungsprozessen (HAHN, 1984). Enterokokken gelten auch als Hygieneindikatoren bei Trinkwasseruntersuchungen und dürfen in gewissen Lebensmitteln nicht nachgewiesen werden (MOSSEL et. al., 1978).

Laktobazillen

Laktobazillen gehören zur Familie der *Lactobacillaceae*, sind gram-positive, Oxidase-negative, Katalase-negative, mikroaerobe bis obligat anaerobe, nicht sporulierende Stäbchen, wobei ihre Morphologien zwischen langen, schlanken und kurzen, gekrümmten Stäbchen variieren. Sie sind relativ resistent gegenüber sauren Bedingungen und wachsen auch unter einem pH-Wert von 4 (MADIGAN et. al., 2001). Weiters haben Laktobazillen die Eigenschaft Glucose entweder nur zu Milchsäure oder auch zu anderen Gärprodukten wie Essigsäure und Kohlendioxid zu vergären. Laktobazillen weisen einen GC-Gehalt von weniger als 54 mol% auf. Sie kommen überall da vor, wo Kohlenhydrate zur Verfügung stehen, wie in Nahrungsmitteln (Milchprodukte, Gemüse, Obst, fermentiertes Fleisch), Genital-,

Respirations- und Gastrointestinaltrakt von Tier und Mensch, im Abwasser und Pflanzen (FELIS et. al., 2007).
Der Nachweis von Laktobazillen ist ein möglicher Verderbnis-Indikator von pflanzlichen Geweben (KNEIFEL et. al., 2002).

Koagulase-positive Staphylokokken

Koagulase-positve Staphylokokken sind gram-positive, nicht sporulierende, Katalase positive, fakultativ anaerobe Kokken. Sie sind relativ resistent gegenüber einem reduzierten Wasserpotential und tolerieren Austrocknung und einen erhöhten Salzgehalt. Sie besiedeln als Kommensalen die Haut und Schleimhäute von Mensch und Tier und kommen auch in der Umwelt, einschließlich auf Lebensmitteln, vor (MADIGAN et. al., 2001).
Sie sind verantwortlich für den Verderb von Lebensmitteln, Enterotoxin-bildende Stämme verursachen Lebensmittelvergiftungen.
Der Nachweis von koagulase-positiven Staphylokokken stellt einen Indikator für Pathogene humanen Ursprungs dar (KNEIFEL et. al., 2002).

Aerobe und anaerobe Sporenbildner

Alle Endosporenbildner zeigen eine phylogenetische Nähe zu den gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Alle endosporenbildende Bakterien kommen in der Natur vornehmlich im Boden vor, sind also primär saprophytische Bodenorganismen. Die Sporenbildung ist für einen Bodenmikroorganismus von Vorteil, da der Boden betreffend Nährstoffangebot, Temperatur und Wasserangebot eine hohe Variabilität aufweist. Die Sporenform stellt eine besonders hitze-und austrocknungsresistente Ruhestruktur dar, die für das Überleben des Bakteriums notwendig ist (MADIGAN et. al., 2001) und die nach Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase oder, wenn vegetative Zellen von einem nährstoffreichen in ein nährstoffarmes Medium kommen, gebildet wird. Der Ruhezustand (Kryptobiose) kann über Monate und Jahre aufrecht erhalten werden.
Zur Kultivierung von Sporenbildnern wird die Probe vor Aufbringen auf entsprechende Medien 10 Minuten auf 80°C erhitzt (Pasteurisation), um effektiv vegetative Zellen abzutöten, während vorhandene Sporen keimfähig bleiben.
Die wichtigsten Gattungen sind *Bacillus*, deren Arten aerob und fakultativ anaerob sind und *Clostridium*, zu denen streng anaerob fermentative Arten gezählt werden.

Endosporenbildner gehören aufgrund ihrer ausgeprägten proteolytischen Eigenschaften zu den wichtigsten Verursachern von Qualitätsabfall und Verderb von Lebensmitteln (MADIGAN et. al., 2001).

1.4.2. Grundlagen zu den molekularbiologischen Methoden

Laut den mikrobiologischen Ergebnissen der untersuchten Arzneipflanzen zeigte sich ein ausgeprägtes vermehrtes Vorhandensein von aeroben Sporenbildnern. Dies bestimmte die weitere molekularbiologische Vorgehensweise, sodass sich der zweite Teil der Arbeit auf die Wahl einer geeigneten PCR-Methode zur raschen Detektion von *Bacillus cereus* in den Pflanzenproben konzentrierte. Schwerpunkt der molekularbiologischen Untersuchung war die Detektierung von *Bacillus cereus* Gruppe- und *Bacillus cereus*-DNA mittels unterschiedlicher Primer aus den kultivierten Isolaten der Kräuterproben.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurensequenzen definierter Länge und wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt. Seine Absicht war es, eine neuwertige DNA-Synthesemethode zu entwickeln, welche DNA durch wiederholte Verdoppelung in mehreren Zyklen mit Hilfe eines Enzyms, der DNA-Polymerase künstlich vervielfältigt.

Das Prinzip der PCR beruht auf 3 Schritten:

1. Denaturierung (Melting, Schmelzen):

Die Reaktionslösung mit der doppelsträngigen DNA (welche kopiert werden soll), der DNA-Polymerase (für die Verdoppelung der DNA während der Replikation zuständig), den Primern (welche als Start-DNA dienen), Mg^{2+}-Ionen (sind für die Funktion der Polymerase essentiell), den Nukleotiden (sind Desoxynukleosidtriphosphate und die Bausteine für den neusynthetisierten DNA-Strang) und Pufferlösung (stellt die geeignete chemische Umgebung sicher) wird auf 94-96°C erhitzt. Dabei werden die beiden komplementären Stränge getrennt

(Denaturierung) und die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen.
Es wird oftmals eine Initialisierung durchgeführt, eine länger anhaltende Erhitzung im ersten Zyklus, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und als Einzelstränge vorliegen.

2. Hybridisierung (Annealing):

Die Temperatur wird so verändert, dass eine spezifische Anlagerung der Primer an die einzelsträngigen DNA-Stränge möglich ist. Die exakte Hybridisierungstemperatur wird durch die Länge und der Sequenz der verwendeten Primer bestimmt und liegt in der Regel 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primersequenzen. Dies entspricht meist einer Temperatur von 55-65°C.
Die Verbindung von Primer und DNA-Strang ist nur dann stabil, wenn beide komplementär zueinander sind und sich Basenpaare ausbilden können.

3. Elongation (Verlängerung, Polymerisation, Amplifikation):

Die Temperatur wird wieder auf etwa 68-72°C erhöht. Das ist die optimale Arbeitstemperatur für die verwendete Polymerase. Sie beginnt am 3`-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang, wobei weitere Nukleotide an die entstehende DNA angebaut werden. Dieser Schritt dauert etwa 30 Sekunden je 500 Basenpaare.
Durch die ständige Wiederholung dieser drei Schritte (die übliche Zyklenanzahl liegt zwischen 30-35) verdoppelt sich jedes Mal die Anzahl an kopierten DNA-Molekülen (MULLIS, 1993).

Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden durch eine Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Proben werden auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend eine Spannung angelegt. Die Elektrophorese ist ein Verfahren, bei dem die Nukleinsäurefragmente in einem elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekulargewicht und ihrer molekularen Form wandern. Große, gefaltete DNA-Moleküle wandern langsamer als kleine oder kompakte Fragmente. Nach einer festgelegten Wanderungszeit können die Positionen der DNA-Moleküle im Gel bestimmt werden. Das Gel wird mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet. Die Länge des PCR-Amplifikats wird mit einem mitgeführten Marker, der DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel läuft, verglichen und bestimmt.

Die Gelelektrophorese wird für die Auftrennung von DNA-Fragmenten von 100 bis 2000 Basenpaaren verwendet.

Detektion von *Bacillus*- DNA

Die Stämme der *Bacillus cereus* Gruppe sind Umweltorganismen und stellen im Groben 4 Arten dar (CHANG et. al., 2003):

1. *Bacillus cereus*:

Steht im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen (DROBNIEWSKI, 1993), ist ein Verderbniserreger, ein Probiotikum für Tiere und ein Pflanzenwachstumspromotor (PECORARO et. al., 2002).

Bacillus cereus ist bekannt als Verursacher lebensmittelinduzierter Gastroenteritis mit emetischen oder mit diarrhöetischen Symptomen, die durch zwei unterschiedliche Toxine verursacht werden (EHLING-SCHULZ et. al., 2004).

2. *Bacillus anthracis*:

Verursacht Anthrax-Krankheiten (Milzbrand) (TURNBULL et. al., 1992; ANDERSEN et. al., 1996). Die Pathogenität von *Bacillus anthracis* beruht einerseits auf der antiphagozytären, aus Glutaminsäure-Polypeptid bestehenden Kapsel und andererseits auf einem Exotoxin. Dieses ruft Ödeme und Gewebsnekrosen hervor, in höheren Dosen wirkt es letal.

3. *Bacillus thuringiensis*:

Ist ein Insektenpathogen (MADIGAN et. al., 2001). Das von dem Bakterium produzierte Insektenlarvizid verursacht eine tödliche Vergiftung bei Larven verschiedener Insektengruppen. Während der Sporenbildung wird ein kristallines Protein gebildet, ein Protoxin, das durch proteolytische Spaltung im Larvendarm in ein Toxin umgewandelt wird. Das Toxin lagert sich an Darmepithelzellen der Larve an und induziert eine Porenbildung, die zum Auslaufen der Wirtszellen und ihrer anschließenden Lyse führt (MADIGAN et. al., 2001).

4. *Bacillus mycoides*:

Wird als Pflanzenwachstumspromotor beschrieben (PETERSEN et. al., 1995).

Die Taxonomie der *Bacillus cereus* Gruppe ist allerdings schwierig, da die Arten sehr eng miteinander verwandt sind. Viele Untersuchungen wurden diesbezüglich durchgeführt wie Multilocus-Enzymelektrophorese-, Pulsfeld-Gelelektropherese-und

Sequenzanalysen von neun verschiedenen chromosomalen Genen (CARLSON et. al., 1994; HELGASON et. al., 2000), Hybridisierung der Gesamt-DNA (ASH et. al., 1991), Sequenzanalysen des 16S-23S Operons und Analysen der *gyrB-gyrA* intergenetic spacer region (HARRELL et. al., 1995), Virulenzanalysen (SEGEEV et. al., 2005), PCR-RFLP Analysen (CHANG et. al., 2003) und AFLP-Analysen (KEIM et. al., 1997).
Eine Unterscheidung zwischen *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus cereus* kann mittels Nachweis des *cry*- Gens getroffen werden. Dieses Gen liegt auf einem Plasmid und codiert das kristalline Protoxin. Fehlt allerdings das Plasmid, ist eine Differenzierung zwischen den beiden Arten nur sehr schwer möglich (HELGASON et. al., 2000; CARLSON, 1994).
Aufgrund des hohen nachgewiesenen Grades der Similarität zwischen den einzelnen Stämmen der *Bacillus cereus* Gruppe geht die Tendenz dahin, dass alle Arten dieser Gruppe in eine Art als „*Bacillus cereus* Gruppe*"* zusammengefasst und vereint werden sollten (CHANG et. al., 2003; PARK, 2007).

Primerwahl

In Anlehnung an die Untersuchungen von CHANG et. al. (2003) und PARK et. al. (2007) können Arten der *Bacillus cereus* Gruppe über das *groEL* Gen als phylogenetischen Marker detektiert werden. Das *groEL* Gen codiert für hoch konservierte housekeeping Proteine, die als molekulare Chaperonine fungieren und für eine korrekte Faltung anderer Proteine und Proteinkomplexe in Bakterien der *Bacillus cereus* Gruppe essentiell sind.
Für die Untersuchung der Arzneipflanzen auf Bakterien-DNA der *Bacillus cereus* Gruppe wurden zwei verschiedene *groEL* Gensequenz-Abschnitte für die Amplifizierung ausgewählt. Die Primer ba1F und ba1R wurden so kreiert, dass ein 533-bp Fragment dieses Gens amplifiziert wird. Das Primerpaar BCGSH-1F und-1R bildet ein 400-bp großes Amplifikat.

Für die molekularbiologische Detektion von *Bacillus cereus* auf Artebene wurde als diagnostischer Marker das *gyrB* Gen herangezogen, wie auch in den Arbeiten von YAMADA et. al. (1999) und PARK et. al. (2007) beschrieben wird. Dieses Gen codiert die B-Protein-Unterheit der Topoisomerase II namens DNA-Gyrase. Dieses

Enzym ist typisch für Bakterien und Archaea und ist essentiell für die Überspiralisierung der DNA (MADIGAN et. al., 2001).
Um eine Unterscheidung von *Bacillus cereus* von *Bacillus anthracis* und *thuringiensis* zu ermöglichen, wurden Primer basierend auf die Nukleotidsequenz von *gyrB* Gen synthetisiert. Das Primerpaar BC1 und BC2r bildet ein 365-bp PCR-Produkt, die Oligonukleotidprimer BCJH-F und BCJH-1R amplifizieren ein 475-bp großes Genfragment.

2. Material und Methoden

2.1. Probenspektrum

Das in dieser Arbeit zur Analyse gelangte Probenspektrum zielt darauf ab, die derzeit in Österreich hauptsächlich durchgeführten Anwendungen der traditionellen chinesischen Medizin abzudecken.

Von den insgesamt 84 untersuchten pflanzlichen Arzneistoffen sind 29 Proben aus Österreich bezogen, 55 Proben wurden direkt aus China bezogen, wobei 28 Proben davon bezüglich der Probenart denen der österreichischen Bezugsquelle entsprachen, um die unterschiedliche Herkunft und dessen Auswirkung auf die Qualität der Drogen zu vergleichen.

Die untersuchten Drogen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der untersuchten Drogen

Proben-nummer	**Chinesische Bezeichnung**		***Lateinischer Name***	**Deutscher Name**
CH24, AT21	泽泻	ze xie	*Alismatis rhizoma*	Orient-Froschlöffelwurzelstock
CH21, AT17	知母	zhi um mu	*Anemarrhenae rhizoma*	Muttergedenkenwurzelstock
CH12, AT1	白芷	bai zhi	*Angelicae dahuricae radix*	Angelikawurzel
CH34, AT29	当 归	dang gui	*Angelicae sinensis radix*	chinesische Engelswurz-Wurzel, chinesische Angelikawurzel
CH37, AT22	茵陈	yin chen	*Artemisiae scopariae herba*	haarförmiges Beifußkraut, Besenbeifußkraut
CH3, AT12	黄芪	huang qi	*Astragali radix*	Astragaluswurzel, Tragantwurzel
CH53	白术	bai zhu	*Atractylodis macrocephalae rhizoma*	großköpfige Atractyloides-Wurzel
CH52	木香	mu xiang	*Aucklandiae radix*	Alantwurzel
CH9, AT23	柴 胡	chai hu	*Bupleuri radix*	chinesische Hasenohrwurzel
CH16, AT19	红 花	hong hua	*Carthami flos*	Saflorblüten, wilder Safran
CH22, AT4	川芎	chuan xiong	*Chuangxiong rhizoma*	Szechuan-Liebstöckelwurzelstock
CH39	狗脊	gou ji	*Cibotii rhizoma*	Cibotiumwurzelstock, Farnat
CH32	桂枝	gui zhi	*Cinnamoni ramulus*	Cassia-Zimtzweige
CH8, AT16	陈 皮	chen pi	*Citri reticulatae pericarpium*	Mandarinenschalen
CH11, AT28	党 参	dang shen	*Codonopsis radix*	Glockenwindenwurzel
CH46	薏苡仁	yi yi ren	*Coicis semen*	Hiobstränensamen, Christustränengrassamen
CH41	黄连	huang lian	*Coptidis rhizoma*	Goldfadenwurzelstock
CH44	郁金	yu jin	*Curcuma radix*	Gelbwurzknollen, Curcumaknollen
CH17, AT20	香附	xiang fu	*Cyperi rhizoma*	Nussgraswurzelstock
CH28	山药	shan yao	*Dioscorae rhizoma*	Yamswurzelknolle

Tabelle 1: Auflistung der untersuchten Drogen (Fortsetzung)

Proben-nummer	**Chinesische Bezeichnung**		***Lateinischer Name***	**Deutscher Name**
CH40	麻黄	ma huang	*Ephedra herba*	Meerträubelkraut
CH10, AT9	栀子	zhi zi	*Gardeniae fructus*	Gelbbeere, Jasminglanz
CH55	人参	ren shen	*Ginseng radix*	Ginsengwurzel
CH15, AT6	北沙渗	bei sha shen	*Glehniae radix*	Glehniawurzel
CH31	甘草	gan cao	*Glycyrrhizae radix et rhizoma*	Ural- Süßholzwurzel
CH43	炙甘草	zhi gan cao	*Glycyrrhizae radix praeparata cum melle*	Ural- Süßholzwurzel, präpariert mit Honig
CH5, AT13	板蓝根	ban lan gen	*Isatidis radix*	Färbewaidwurzel
CH35, AT3	大枣	da zao	*Jujubae fructus*	Jujubenfrüchte, chinesische Dattelfrüchte
CH25, AT2	益母草	yi mu cao	*Leonuri herba*	chinesisches Mutterkraut, Löwenschwanzkraut
CH6, AT26	女贞子	nü zhen zi	*Ligustri lucidi fructus*	Füchte des chinesischen Liebstöckl
CH36, AT11	金银花	jin yin hua	*Lonicerae japonicae flos*	japanische Geißblattblüten
CH19, AT18	辛夷	xin yi	*Magnoliae flos*	Magnolienblüten
CH26	薄荷	bo he	*Menthae herba*	chinesisches Ackerminzekraut
CH2	桑叶	sang ye	*Mori folium*	Maulbeerblätter
CH4, AT27	牡丹皮	mu dan pi	*Moutan cortex*	Strauchpäonienwurzel
CH29	三七	san qi	*Notoginseng radix*	Sanchiwurzel
CH30, AT14	麦冬	mai dong	*Ophiopogonis radix*	Schlangenbartwurzel
CH7, AT7	白 芍	bai shao	*Paenia radix alba*	weiße Pfingstrosenwurzel
CH33	桃仁	tao ren	*Persicae semen*	Pfirsichsamen
AT10	黄柏	huáng bǎi	*Phellodendri cortex*	Gelbbaumrinde, Korkbaumrinde
CH42	半夏	ban xia	*Pinelliae rhizoma*	Mittsommerknolle
CH49	玉竹	yu zhu	*Polygonati odorati rhizoma*	Sibirischer Weißwurz-Wurzelstock, Salomonssiegel

Tabelle 1: Auflistung der untersuchten Drogen (Fortsetzung)

Proben-nummer	**Chinesische Bezeichnung**		***Lateinischer Name***	**Deutscher Name**
CH18, AT5	茯苓	fu ling	*Poria*	Kokospilzmyzel
CH1	夏枯草	xia ku cao	*Prunellae spica*	Braunellenähren
CH47	葛根	ge gen	*Puerariae thomsonii radix*	Kopoubohnenwurzel
CH51	大黄	da huang	*Rhei radix et rhizoma*	Rhababerwurzelstock
CH23, AT25	生地黄	sheng di huang	*Rhemanniae radix (viridae)*	Süßer Braunwurz
CH54	熟地黄	shu di huang	*Rhemanniae radix praeparata*	Süßer Braunwurz, behandelt
CH14, AT24	丹参	dan shen	*Salviae mitiorrhizae radix et rhizoma*	Rotwurzsalbeiwurzel
CH48	防风	fang feng	*Saposhnikoviae radix*	Ledebouriellawurzel
CH13, AT8	玄 参	xuan shen	*Scrophulariae radix*	Ningpo- Braunwurzwurzel
CH27, AT15	黄芩	huang qin	*Scutellariae radix*	Baikal- Helmkraut
CH50	三棱	san leng	*Sparganii rhizoma*	astiger Igelkolbenwurzelstock
CH45	川楝子	chuan lian zi	*Toosendan fructus*	chinesische Holunderfrüchte, Paternosterbaum-Früchte
CH20	狗藤	gou teng	*Uncariae ramulus cum uncis*	indischer Morgensternzweig, Klimmstrauchzweig
CH38	酸枣仁	suan zao ren	*Zizyphi spinosae semen*	Stacheljujubensamen, wilde Dornkirschensamen

Im Folgenden werden die untersuchten pflanzlichen Drogen im Einzelnen vorgestellt (WU, 2005; SOUMYANATH, 2006; HEMPEN et. al., 2007). Die Abbildungen zeigen die einzelnen Arzneipflanzen fotografiert in sterilen Petrischalen mit Durchmesser von 90 mm.

Alismatis rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Orient-Froschlöffelwurzelstock
Stammpflanze: *Alisma orientale, Alisma plantago-aquatica*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Blase und Niere, wirkt harn-und schweißtreibend, diuretisch, senkt den Blutzuckerspiegel.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-15g.

Abbildung 1: *Alismatis rhizoma*

Anemarrhenae rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Muttergedenkenwurzelstock
Stammpflanze: *Anemarrhena asophodeloides*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Magen, Lunge, Niere, wirkt antipyretisch, in vitro antibiotisch, antimykotisch und hat einen cortisonartiger Effekt, weiters hemmt es die Thrombozytenaggregation.
In höheren Dosen können Darmkoliken und Diarrhöe aufgrund des Saponingehalts auftreten.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 6-12g.

Abbildung 2: *Annemarrhenae rhizoma*

Saposhnikoviae radix:

Deutsche Bezeichnung: Ledebouriellawurzel
Stammpflanze: *Ledebouriella divaricata, Sapshnikovia divaricata*
Hat einen scharfen, süßen Geschmack, zielt auf Blase, Leber, Lunge, Milz und Magen, wirkt schwach antipyretisch, antimikrobiell und wirkt als Antidot für Arsen.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-9g.

Abbildung 3: *Saposhnikoviae radix*

Cinnamomi cassiae ramulus:

Deutsche Bezeichnung: Cassia-Zimtzweige
Stammpflanze: *Cinnamomum cassia*
Hat einen scharfen, süßen Geschmack, zielt auf Lunge, Herz und Blase, wirkt anitbakteriell, antimykotisch, antiviral, schmerzstillend, beseitigt Blähungen und Verdauungsstörungen, verbessert die Herzfunktion, harntreibend.
Keine Anwendung bei Gravidität, bei fiebrigen Erkrankungen und bei großer Hitze!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 4: *Cinnamomi cassiae ramulus*

Aucklandiae radix:

Deutsche Bezeichnung: Alantwurzel
Stammpflanze: *Inula helium, Inula racemosa*
Hat einen scharfen, bitteren Geschmack, zielt auf Milz, Magen, Lunge und Dickdarm, wirkt expektorierend, cholagog, karminativ, diuretisch und kann bei Erkrankungen im Bereich der Atemwege, des Magen-Darm-Traktes und der Niere und ableitenden Harnwege eingesetzt werden. Inhaltsstoffe. u. a. Sesquiterpene.
Anwendung erfolgt nach Kochzeit (Arzneimittel zum Schluß zugeben, kurz aufkochen und 3 min ziehen lassen) in einer Tagesdosis zwischen 1-10g.

Abbildung 5: *Aucklandiae radix*

Curcuma radix:

Deutsche Bezeichnung: Gelbwurzknollen, Curcumaknollen
Stammpflanze: *Curcuma longa*
Hat einen scharfen, bitteren Geschmack, zielt auf Lunge, Herz und Leber, wirkt antihepatotoxisch, antihyperlipidämisch.
Bei Gravidität ist die Anwendung verboten!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 6: *Curcuma radix*

Zizyphi spinosae semen:

Deutsche Bezeichnung: Stacheljujubensamen, wilde Dornkirschensamen
Stammpflanze: *Zizyphus spinosa*
Hat einen süß-sauren Geschmack, zielt auf Lerber, Herz und Gallenblase, wirkt inhibitorisch auf das Herz; wird eingesetzt bei Hypertonie.
Inhaltsstoffe: u.a. Saponine, Alkaloide, Flavone, Vitamin C. Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zw. 10-15g.

Abbildung 7: *Zizyphi spinosae semen*

Menthae herba:

Deutsche Bezeichnung: chinesisches Ackerminzekraut
Stammpflanze: *Mentha haplocalyx , M. arvensis*
Hat einen scharfen Geschmack, zielt auf Lunge und Leber, wirkt antibakteriell, entzündungshemmend, krampflösend, schmerzstillend und schweißtreibend.
Die vorhandene Toxizität kann die Laktation behindern, deshalb keine Anwendung bei stillenden Müttern! Anwendung erfolgt nach Kochzeit (Wasser kochen, Arzneimittel am Schluß zugeben und 10 min ziehen lassen) in einer Tagesdosis zwischen 1-8g.

Abbildung 8: *Menthae herba*

Toosendan fructus:

Deutsche Bezeichnung: chinesische Holunderfrüchte, Paternosterbaum-Früchte
Stammpflanze: *Melia toosendan*
Hat einen scharfen Geschmack, zielt auf Leber, Herzbeutel, Dünndarm und Magen, wirkt antihelmintisch und antibiotisch.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-12g.

Abbildung 9: *Toosendan fructus*

Pinelliae rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Mittsommerknolle
Stammpflanze: *Pinellia ternata*
Hat einen scharfen Geschmack, zielt auf Lunge, Milz und Magen, wirkt als Antidot für Strychnin und Acetylcholin.
Die vorhandene Toxizität verursacht Brennen der Mundschleimhaut, exzessiver Gebrauch kann zur Schwächung der Mitte führen. Anwendung während Gravidität nur mit Vorsicht!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 6-12g.

Abbildung 10: *Pinelliae rhizoma*

Mori folium:

Deutsche Bezeichnung: Maulbeerblätter
Stammpflanze: *Morus alba*
Hat einen bitteren Geschmack, wirkt als Karies-Vorbeugung, ist cholesterin- und blutdrucksenkend, anticancerogen, antibiotisch.
Anwendung erfolgt nach Kochzeit (Blätter am Schluß zugeben, kurz aufkochen lassen, 3 min ziehen lassen).
Anwendung in einer Tagesdosis zwischen 5-10g.

Abbildung 11: *Mori folium*

Uncariae ramulus et uncus:

Deutsche Bezeichnung: indischer Morgensternzweig, Klimmstrauchzweig
Stammpflanze: *Uncaria rhynchophylla*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Leber und Herzbeutel, wirkt bei Hypertonie, Schwindel, Kopfschmerzen und Reizbarkeit.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 6-15g.

Abbildung 12: *Uncariae ramulus et uncus*

Prunella spica:

Deutsche Bezeichnung: Braunellenähren
Stammpflanze: *Prunella vulgaris*
Hat einen scharfen, bitteren Geschmack, zielt auf Leber, Gallenblase und Lunge, wirkt antibakteriell, antimykotisch, galletreibend und wird bei Hypertonie angewendet. Inhaltsstoffe sind unter anderem Vitamin B 1, C, K, Tannin, Oleanolsäure.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 9-15g.

Abbildung 13: *Prunella spica*

Puerariae thomsonii radix:

Deutsche Bezeichnung: Kopoubohnenwurzel
Stammpflanze: *Pueraria lobata*
Hat einen süßen, scharfen Geschmack, zielt auf Milz und Magen, wirkt krampflösend, kreislaufördernd, fiebersenkend, leicht blutzuckersenkend und reduziert den Blutzuckerspiegel.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-15g.

Abbildung 14: *Puerariae thomsonii radix*

Angelicae dahuricae radix:

Deutsche Bezeichnung: Angelikawurzel
Stammpflanze: *Angelica dahurica, Angelica taiwaniana*
Hat einen bitteren, scharfen Geschmack, zielt auf Magen und Lunge, wirkt schmerzlindernd bei Zahn-und Kopfschmerzen.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-9g.

Abbildung 15*: Angelicae dahuricae radix*

Paeonia radix alba:

Deutsche Bezeichnung: weiße Pfingstrosenwurzel
Stammpflanze: *Paeonia lactiflora*
Hat einen bitteren, sauren Geschmack, zielt auf Leber und Milz, wirkt antihypertensiv, spasmolytisch, antiphlogistisch, sedativ, koronardilertierend und hemmt die Thrombozytenaggregation.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-15g.

Abbildung 16: *Paeonia radix alba*

Artemisiae scopariae herba:

Deutsche Bezeichnung: haarförmiges Beifußkraut, Besenbeifußkraut
Stammpflanze*: Artemimsiacapillaris, A. scoparia*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Leber, Gallenblase, Milz und Magen, wirkt blutdrucksenkend und antipyretisch.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 10-15g.

Abbildung 17: *Artemisiae scopariae herba*

Astragali radix:

Deutsche Bezeichnung: Astragaluswurzel, Tragantwurzel
Stammpflanze: *Astragalus membranaceus, A. mongolicus*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Milz und Lunge, wirkt krampflösend, harntreibend, nervenanregend, antibakteriell, senkt den Blutdruck und den Blutzuckerspiegel und ist immunstimulierend.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 10-15g.

Abbildung 18: *Astragali radix*

Angelicae sinensis radix:

Deutsche Bezeichnung: chinesische Engelswurz- Wurzel, chinesische Angelikawurzel
Stammpflanze: *Angelicae sinensis*
Hat einen süßen, scharfen Geschmack, zielt auf Leber, Herz und Milz, wirkt leicht sedierend und in vitro antibiotisch, hat einen hohen Anteil an Folsäure und Vitamin B 12.
Bei Gravidität ist Anwendung verboten!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 19: *Angelicae sinensis radix*

Bupleuri radix:

Deutsche Bezeichnung: chinesische Hasenohrwurzel
Stammpflanze: *Bupleurum chinense, B. falcatum*
Hat einen bitteren, scharfen Geschmack, zielt auf Leber, Gallenblase, Herzbeutel und auf alle drei Wärmebereiche, wirkt blutdrucksenkend und antipyretisch.
Bei der Einnahme größerer Dosen können wegen des Saponingehalts Gastroenteritis, Darmkolik und Diarrhoe auftreten.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 10-15g.

Abbildung 20: *Bupleuri radix*

Citri reticulatae pericarpium:

Deutsche Bezeichnung: Mandarinenschalen
Stammpflanze: *Citrus reticulata, C. tangerina*
Hat einen bitteren, scharfen Geschmack, zielt auf Lunge, Milz und Magen, wirkt antiasthmatisch, verdauungsfördernd, entzündungshemmend, lindert Blähungen und Verstopfungen, ist schleimlösend und wirksam bei akuter Mastitis.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 21: *Citri reticulatae pericarpium*

Carthami flos:

Deutsche Bezeichnung: Saflorblüten, Färbedistel
Stammpflanze: *Carthamus tinctorius*
Hat einen scharfen Geschmack, zielt auf Leber und Herz, wirkt schmerzlindernd, wird bei koronarer Herzkrankheit und bei Schwellungen und Hämatomen eingesetzt.
Bei Gravidität ist die Anwendung verboten!
Anwendung erfolgt nach Kochzeit (Blüten am Schluß zugeben, kurz aufkochen lassen, 3 min. ziehen lassen) in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 22: *Carthami flos*

Codonopsis radix:

Deutsche Bezeichnung: Glockenwindenwurzel
Stammpflanze: *Codonopsis pilosula*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Milz und Lunge, wirkt blutdrucksenkend, immunstimulierend, nervenanregend, erhöht den Blutzuckerspiegel und begünstigt die Erythropoese.
Bei Gravidität Anwendung mit Vorsicht!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-15g.

Abbildung 23: *Codonopsis radix*

Chuanxiong rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Szechuan-Liebstöckelwurzel
Stammpflanze: *Ligusticum chuanxiong hort.*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Leber, Gallenblase und Perikard, wird in Gynäkologie eingesetzt und wirkt schmerzlindernd und positiv auf den Blutkreislauf.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 24: *Chuanxiong rhizoma*

Cyperi rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Nussgraswurzelstock
Stammpflanze: *Cyperus rotundus*
Hat einen bitteren scharfen Geschmack, zielt auf Leber und alle drei Wärmebereiche, wirkt schmerzstillend, antibakteriell, löst Uterus-Spasmen, lindert Menstruationsbeschwerden.
Bei Gravidität Anwendung verboten!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 6-15g.

Abbildung 25: *Cyperi rhizoma*

Glehniae radix:

Deutsche Bezeichnung: Glehniawurzel
Stammpflanze: *Glehnia littoralis*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Lunge, Milz und Magen, enthält unter anderem Alkaloide, wird angewendet bei Husten und Heiserkeit, wirkt schleimlösend.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 9-15g.

Abbildung 26: *Glehniae radix*

Gardeniae fructus:

Deutsche Bezeichnung: Gelbbeere, Jasminglanz
Stammpflanze: *Gardenia jasminoides*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Leber, Herz, Leber und Magen, wirkt choleretisch und antihepatotoxisch.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 27: *Gardeniae fructus*

Isatidis radix:

Deutsche Bezeichnung: Färbewaidwurzel
Stammpflanze: *Isatis tinctoria, Baphicacanthus cusia*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Lunge, Herz und Magen, wirkt antimikrobiell und in vitro antiparasitär. Wird angewendet bei Enzephalitis, Mumps und akuter Hepatitis.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 15-30g.

Abbildung 28: *Isatidis radix*

Jujubae fructus:

Deutsche Bezeichnung: Jujubenfrüchte, chinesische Dattelfrüchte
Stammpflanze: *Zizyphus jujuba*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Milz, Herz und Magen, wirkt reizlindernd, beruhigend und antiallergen. Wird angewendet als Nahrungs- und Stärkungsmittel, bei Appetitlosigkeit und zur Prophylaxe von Lebererkrankungen und Stressgeschwüren.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 29: *Jujubae fructus*

Lonicerae flos:

Deutsche Bezeichnung: japan. Geißblattblüten
Stammpflanze: *Lonicera japonica*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Lunge, Herz, Dickdarm und Magen, wirkt in vitro antibakteriell. Anwendung bei Mastitis, Erysipel, chron. Konjunktivitis, Keratitis und Ulzera der Kornea.
Bei Überdosierung kommt es wegen des Saponingehalts zu Reizung des Gastrointestinaltraktes und der Harnwege.
Anwendung erfolgt nach Kochzeit (Blüten am Schluß zugeben, kurz aufkochen lassen, 3 min. ziehen lassen) in einer Tagesdosis zwischen 10-15g.

Abbildung 30: *Lonicerae flos*

Ligustri lucidi fructus:

Deutsche Bezeichnung: Füchte des chinesischen Liebstöckl
Stammpflanze: *Ligustrum ludidum*
Hat einen süßen, bitteren Geschmack, zielt auf Leber und Nieren, wirkt antibakteriell, stärkt die Harnfunktion, ist immunsystemstimulierend und harntreibend.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 9-15g.

Abbildung 31: *Ligustri lucidi fructus*

Leonuri herba:

Deutsche Bezeichnung: chinesisches Mutterkraut, Löwenschwanzkraut
Stammpflanze: *Leonurus heterophyllus*
Hat einen scharfen, bitteren Geschmack, zielt auf Herz, Herzbeutel, Leber und Nieren.
Anwendung bei Menstruationsstörungen, gynäkologischen Beschwerden und Schmerzen im Abdomen. In hohen Dosen (bis zu 60g) wird es zur Behandlung von Ödemen bei Glomerulonephritis angewendet.
Bei Gravidität Anwendung verboten!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 10-30g.

Abbildung 32: *Leonuri herba*

Moutan cortex:

Deutsche Bezeichnung: Strauchpäonienwurzel
Stammpflanze: *Paeonia suffruticosa*
Hat einen scharfen, bitteren Geschmack, zielt auf Leber, Herz und Nieren, wirkt beruhigend, schlaffördernd, analgetisch, in vitro antibiotisch.
Wird angewendet bei Hypertonie.
Bei Gravidität Anwendung verboten!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-12g.

Abbildung 33: *Moutan cortex*

Magnoliae flos:

Deutsche Bezeichnung: Magnolienblüten
Stammpflanze: *Magnolia liliflora, M. biondii*
Hat einen scharfen Geschmack, zielt auf Lunge und Magen, wirkt in vitro antimykotisch und antibiotisch.
Bei Überdosierung kann Schwindel oder Rötung der Augen verursachen, Pflanzenhaare können eine Irritation des Halses hervorrufen, dann sollte die Droge in einem Tuch abgekocht werden.
Anwendung erfolgt nach Kochzeit (Blüten am Schluß zugeben, kurz aufkochen lassen, 3 min. ziehen lassen) in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 34: *Magnoliae flos*

Ophiopogonis radix:

Deutsche Bezeichnung: Schlangenbartwurzel
Stammpflanze: *Ophiopogon japonicus*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Lunge, Magen, Herz und Dickdarm.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-18g.

Abbildung 35: *Ophiopogonis radix*

Phellodendri cortex:

Deutsche Bezeichnung: Gelbbaumrinde, Korkbaumrinde
Stammpflanze: *Phellodendron amurense*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Nieren, Blase, Dickdarm und Dünndarm, wirkt antibiotisch. Wird angewendet bei Meningitis, Dysenterie, Konjunktivitis, äußerlich bei Vaginitis, Trichomonadenkolpitis, Ekzemen am Ohr.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 10-15g.

Abbildung 36: *Phellodendri cortex*

Poria alba:

Deutsche Bezeichnung: Kokospilzmyzel
Stammpflanze: *Poriae cocos*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Lunge, Herz, Milz, Nieren und Magen, wirkt diuretisch.
Keine Langzeitanwendung oder Anwendungen in hoher Dosierung!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 10-15g.

Abbildung 37: *Poria alba*

Scrophulariae radix:

Deutsche Bezeichnung: Ningpo-Braunwurzwurzel
Stammpflanze: *Scrophularia ningpoensis*
Hat einen süßen, bitteren Geschmack, zielt auf Lunge, Nieren und Magen, wirkt vasodilatierend und in vitro antibiotisch. Wird angewendet bei renal bedingter Hypertonie.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 6-30g.

Abbildung 38: *Scrophulariae radix*

Scutellariae radix:

Deutsche Bezeichnung: Baikal-Helmkraut
Stammpflanze: *Scutellaria baicalensis*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Lunge, Herz, Gallenblase, Dickdarm, Dünndarm und Magen, wirkt diuretisch, antibiotisch, krampflösend, fiebersenkend und senkt den Cholesterinspiegel.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 6-15g.

Abbildung 39: *Scutellariae radix*

Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Rotwurzsalbeiwurzel
Stammpflanze: *Labiatae*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Leber, Gallenblase, Milz und Magen, wirkt schmerzlindernd und beruhigend.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 10-15g.

Abbildung 40: *Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma*

Rhei radix et rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Rhababerwurzelstock
Stammpflanze: *Rheum palmatum*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Magen, Dickdarm, Leber und Milz, hat pharmazeutische, analgetische, antiiflammatorische Wirkung. Keine Anwendung in der Stillzeit, während der Menstruation, post partum und bei Kindern unter 12 Jahren. Anwendung während Gravidität wegen reflektorischer Erregung des Uterus verboten!
Die Länge der Kochzeit bestimmt die Wirkung. Kochzeiten über 10 min reduzieren den purgativen Effekt.
Tagesdosis zwischen 1-12g.

Abbildung 41: *Rhei radix et rhizoma*

Glycyrrhizae radix / Glycyrrhicae radix preparata cum mele:

Deutsche Bezeichnung: Süßholzwurzel
Stammpflanze: *Leguminosae*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Milz, Lunge, Magen, Herz und Leber, wirkt antibakteriell, entzündungshemmend, krampflösend, antiallergisch, blutdrucksenkend, galletreibend. Keine längere Einnahme in höheren Dosen, bei Gravidität Anwendung mit Vorsicht! Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 1-15g.

Abbildung 42: *Glycyrrhizae radix*

Cibotii rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Cibotiumwurzelstock, Farnat
Stammpflanze: *Cibotium barometz*
Hat einen süßen, bitteren Geschmack, zielt auf Leber und Nieren, wirkt harmonisierend und fördernd auf die Leberfunktion.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 43: *Cibotii rhizoma*

Coptidis rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Goldfadenwurzelstock
Stammpflanze*: Coptis chinensis, Coptis teetoides*
Hat einen bitteren Geschmack, zielt auf Leber, Herz, Gallenblase, Dickdarm, und Magen, wirkt antibakteriell, blutdrucksenkend, beruhigend, entzündungshemmend, antimykotisch und stimuliert die Bildung von Acetylcholin, enthält Beberin.
Keine Langzeitanwendung wegen potentieller Schädigung der Mitte.
Anwendung bei Gravidität nur mit Vorsicht!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 1-10g.

Abbildung 44: *Coptidis rhizoma*

Ephedra herba:

Deutsche Bezeichnung: Meerträubelkraut
Stammpflanze: *Ephedra sinica, E. equsitana*
Hat einen scharfen, bitteren Geschmack, zielt auf Lunge und Blase, wirkt sympathomimetisch (bronchodilatatorisch, lokal vasokonstriktorisch, zenral stimulierend) und antiphlogistisch.
In höheren Dosen oder bei Langzeitanwendung kann es zu starken Nebenwirkungen kommen.
Anwendung bei Gravidität nur mit Vorsicht!
Anwendung erfolgt nach 10 min Kochzeit (bei Schaumbildung eventuell extra abkochen und Schaum abschöpfen) in einer Tagesdosis zwischen 1-10g.

Abbildung 45: *Ephedra herba*

Ginseng radix:

Deutsche Bezeichnung: Ginsengwurzel
Stammpflanze: *Panax ginseng*
Hat einen süßen, leicht bitteren Geschmack, zielt auf Lunge, Herz und Milz, wirkt stärkend, anregend, senkt den Blutzucker- und Cholesterinspiegel und ist immunstimulierend.
Anwendung erfolgt nach Kochzeit (im Wasserbad bis zu 3 h kochen) in einer Tagesdosis zwischen 1-10g.

Abbildung 46: *Ginseng radix*

Sparganii rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: astiger Igelkolbenwurzelstock
Stammpflanze: *Scirpus flabiatilis, Sparganium stoloniferum*
Hat einen scharfen, bitteren Geschmack, zielt auf Leber und Milz, wird nach neuerer Forschung in der Onkologie in Kombination mit *Curcumae longae rhizoma* (Jianghuang) angewendet.
Bei Gravidität ist Anwendung verboten!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 47: *Sparganii rhizoma*

Persicae semen:

Deutsche Bezeichnung: Pfirsichsamen
Stammpflanze: *Prunus persica*
Hat einen süßen, bitteren Geschmack, zielt auf Herz, Leber, Dickdarm und Lunge, wirkt leicht antikoagulierend durch alkoholische Extrakte.
Inhaltsstoffe: u. a. Amygdalin, Emulsin
Wegen des Amygdalingehalts mittelstark toxisch und bei Gravidität Anwendung verboten!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 3-10g.

Abbildung 48: *Persicae semen*

Coices semen:

Deutsche Bezeichnung: Hiobstränensamen, Christustränengrassamen
Stammpflanze: *Coix lachryma jobi*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Lunge, Milz, Nieren und Magen, wirkt diuretisch.
Inhaltsstoffe u. a. Vitamin B1 und Coixol.
Bei Gravidität Anwendung mit Vorsicht, eventuell vermeiden!
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 6-30g.

Abbildung 49: *Coices semen*

Polygonati rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Sibirischer Weißwurz-Wurzelstock, Salomonssiegel
Stammpflanze: *Polygonatum sibiricum*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Lunge und Milz, wird angewendet bei Verdauungsschwäche, geringer Belastbarkeit und trockenem Husten.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 6-15g.

Abbildung 50: *Polygonati rhizoma*

Notoginseng radix:

Deutsche Bezeichnung: Sanchiwurzel
Stammpflanze: *Panax notoginseng*
Hat einen süßen, bitteren Geschmack, zielt auf Leber und Magen, fördert die Blutzirkulation und wirkt schmerzlindernd.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 1-3g.

Abbildung 51: *Notoginseng radix*

Dioscorae rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: chinesische Yamswurzelknolle
Stammpflanze: *Dioscorea villosa*
Zielt auf Milz und Magen, fördert Nierenfunktion und Verdauung, wirkt entzündungshemmend, gefäßerweiternd und krampflösend und wird bei Wechseljahrenbeschwerden eingesetzt.
Enthält Diosgenin.
Anwendung erfolgt nach 10 min Kochzeit in einer Tagesdosis von 10g

Abbildung 52: *Dioscorae rhizoma*

Rehmannia radix praeparata:

Deutsche Bezeichnung: süßer Braunwurz
Stammpflanze: *Rehmannia glutinosa libosch.*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Leber und Nieren, stärkt und beruhigt den Körper.
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 10-30g.

Abbildung 53: *Rhemannia radix praeparata*

Atractylodis macrocephalae rhizoma:

Deutsche Bezeichnung: Großköpfige Atractylodes-Wurzel
Stammpflanze: *Compositae*
Hat einen süßen Geschmack, zielt auf Milz und Magen,
Wird angewendete bei Appetitlosigkeit und abdominalen Beschwerden
Anwendung erfolgt nach 20 min Kochzeit in einer Tagesdosis zwischen 5-15g.

Abbildung 54: *Atractylodis macrocephalae rhizoma*

2.2. Mikrobiologische Methoden

Folgende **ISO-NORMEN** wurden bei der mikrobiologischen Untersuchung der Proben angewandt:

DIN EN ISO 4833, Ausgabe Juli 2004, Untersuchung von Lebensmitteln, Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen, Koloniezählverfahren bei 30 °C

ISO 7954, Ausgabe November 1987, Microbiology-General guidance for enumeration of yeasts and moulds-Colony count technique at 25 °C

DIN EN ISO 6888- 1, Ausgabe Dezember 2003, Untersuchung von Lebensmitteln, Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und andere Arten) in Lebensmitteln, Teil 1: Verfahren mit Baird Parker Agar

ISO 21528- 2, Ausgabe August 2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*-Part 2: Colony-count method

Herstellung der Nährmedien

MRS-Agar (Merck, 1.106.600.500)
Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE
68,2 g MRS-Agar in 1 l destilliertem Wasser lösen durch Erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min.
Im Wasserbad temperieren (50 °C) und Platten gießen.

Plate Count-Agar (Merck, 1.05463.0500)
Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar
22,5 g PC-Agar in 1 l destilliertem Wasser lösen durch Erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min.
Bis zum Ausgießen der Platten im Wasserbad temperieren (50 °C).

VRBD-Agar (Merck, 1.10275.0500)

Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach MOSSEL

39,5 g VRBD-Agar in 1 l destilliertem Wasser lösen, in der Mikrowelle solange kochen unter regelmäßigen Umschwenken kochen, bis der Nährboden vollständig gelöst ist. Anschließend nicht länger als 2 min. weiterkochen. Nicht autoklavieren !

Bis zum Ausgießen der Platten im Wasserbad temperieren (50 °C).

DRCM-Agar (Merck, 1.11699.0500)

Clostridien-Differential-Bouillon

27,5 g DRCM-Agar und 12 g Agar bacteriological (Oxoid, LP 0011) in 1 l destilliertem Wasser durch Erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min.

Bis zum Ausgießen der Platten im Wasserbad temperieren (50 °C).

CASO-Agar (OXOID, CM 0131)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar

40 g Caso-Agar in 1 l destilliertem Wasser suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min.

Im Wasserbad temperieren (50 °C) und Platten gießen.

Bacillus cereus Medium, PEMBA-Formulierung (LABM, 193)

41 g *Bacillus cereus* Medium in 950 ml destilliertem Wasser suspendieren, für 10 min quellen lassen, durchmischen und autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min.

Auf 47°C abkühlen und aseptisch 50 ml X073 und 2 Ampullen X193 dazu geben, mischen und Platten gießen.

PEMBA (OXOID, CM 617)

Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar

20,5 g PEMBA-Agar in 475ml destilliertem Wasser suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min. Im Wasserbad temperieren (50 °C) und Platten gießen. Auf 50°C abkühlen lassen. Aseptisch den gelösten Inhalt von 1 Röhrchen *Bacillus cereus* Selektiv-Supplement (Art. Nr.: SR 099E) und 25ml Eigelb-Emulsion (Art. Nr.: SR 47) dazu geben. Gut mischen und Platten gießen.

Baird-Parker-Agar (OXOID, CM 0275)

63 g Baird-Parker-Agar in 1 l destilliertem Wasser suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min. Auf 50°C abkühlen lassen. Aseptisch 50 ml Eigelb-Kaliumtellurit-Emulsion (Art.-Nr. SR54) zufügen. Gut mischen und Platten gießen.

YGC-Agar (Merck, 1.16000.0500)

Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar

40 g YGC-Agar in 1 l destilliertem Wasser lösen durch Erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min.

Bis zum Ausgießen der Platten im Wasserbad temperieren (50 °C).

Enterococcosel-Agar (BBL-Becton Dickinson, 212205)

Selektivnährboden zur Isolierung von Enterokokken

56 g EC-Agar in 1 l destilliertem Wasser suspendieren. Gut durchmischen, unter wiederholtem Schütteln erhitzen und zur vollständigen Lösung des Pulvers 1 min kochen lassen. Autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min. Im Wasserbad temperieren (50 °C) und Platten gießen.

Glucoseagar

10 g Pepton
1,5 g Hefeextrakt
10 g Glucose
5 g Natriumchlorid
0,015 g Bromocresolrot
12,5 g Agar
1 l Aqua dest.

Gut durchmischen, unter wiederholtem Schütteln erhitzen und zur vollständigen Lösung des Pulvers 1 min kochen lassen. Je 10 ml in Glasröhrchen füllen. Autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min.

Nutrientagar (Merck, 1.05450.0500)
20 g Nähragar in 1 l destilliertem Wasser lösen durch Erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min. Im Wasserbad temperieren (50 °C) und Platten gießen.

Peptonwasser gepuffert (OXOID, CM 0509)
20 g in 1 l destilliertem Wasser lösen durch Erhitzen in der Mikrowelle, autoklavieren bei 121°C, 0,8 bar für 15 min.

Angewandte Färbemethode

Methylenblaufärbung

Einen Tropfen sterile 0,85%ige Kochsalzlösung auf einen Glasobjektträger geben und verdächtige Kolonie einrühren. Nach dem Trocknen hitzefixieren und für 10 min in die Methylenblau-Färbelösung stellen, danach mit Leitungswasser spülen. Nach dem Trocknen wird mit Immersionsöl unter 100-facher Vergößerung mikroskopiert.

Probenansatz- Durchführung

- Einwiegen von 25 g Probe in einen sterilen 1 l Erlenmayerkolben
- Zugabe von 225 ml sterilem Peptonwasser
- 5 min am Schüttler mischen (180-200 U/min)
- 5 min stehen lassen
- 5 min am Schüttler mischen
- 2 min absetzen lassen
- Verdünnungsreihe herstellen (1 ml Probe plus 9 ml steriles Peptonwasser)
- Für Pasteurisation: 1 ml Probe in steriles Röhrchen pipettieren und für 10 min bei 80 °C inkubieren, davon die Verdünnungsreihe herstellen.

Für die Gesamtkeimzahl, Enterobakterien, Clostridien, Hefen und Schimmelpilze wurde das Gussverfahren, für Enterokokken, Laktobazillen, aerobe Sporenbildner und Staphylokokken wurde das Spatelverfahren angewendet, wobei jede Probe im Doppelansatz untersucht wurde.
Für den Nachweis von aeroben Sporenbildnern und Clostridien wurde zusätzlich die Laborpasteurisation durchgeführt.

Folgende Verdünnungsstufen wurden analysiert:
Auf Caso-Agar wurden die Proben bis zu einer Verdünnung von 10^{-7}, auf allen anderen Nährböden wurden die Proben bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} untersucht.

Inkubation

Tabelle 2: Verwendete Nährmedien

Mikroorganismen	Nährmedium	Methode	Inkubation
Gesamtkeimzahl	Plate Count Agar	Gussverfahren	30 °C für 3 Tage
Enterobakterien	VRBD-Agar	Gussverfahren, mit Überschichtung	37 °C für 24 Std.
	Nutrientagar	Fraktionierter Ausstrich	37 °C für 24 Std.
	Glucoseagar	Agarstichkultur	37 °C für 24 Std.
Hefen, Pilze	YGC-Agar	Gussverfahren	25 °C für 3/ 4/ 5 Tage
Aerobe Sporenbildner	Caso-Agar	Spatelverfahren/ Pasteurisation	30- 35 °C für 24- 48 Std.
	PEMBA-Agar	Spatelverfahren	30 °C für 24- 48 Std.
Enterokokken	Enterococcosel-Agar	Spatelverfahren	35- 37 °C für 24- 48 Std.
Laktobazillen	MRS-Agar	Spatelverfahren	anaerob 30°C für 3 Tage
Staphylokokken	Baird Parker-Agar	Spatelverfahren	35- 37 °C für 24- 48 Std.
Clostridien	DRCM-Agar	Gussverfahren/ Pasteurisation	anaerob 44 °C für 48 Std.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Nährmedien auf Wachstum von Keimen geprüft. Verdächtige Kolonien wurden mittels Methylenblaufärbung verifiziert.

Zur Detektion von Enterobakterien wurden verdächtige Kolonien auf Nutrientagar für die Oxidasereaktion isoliert. Bei negativer Oxidasereaktion wurden die Isolate mittels einer Stichagar-Methode auf Glucoseverwertung getestet. Als *Enterobacteriaceae* wurden nur Oxidase-negative und Fermentationstest-positive Kolonien gewertet (ISO NORM 21528-2).

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. DNA-Isolierung

Die DNA-Purifikation erfolgte mittels Quiagen Gentra Puregene Yeast/Bact Testkit nach dem Protokoll für gram-positive Bakterien.

Bacillus cereus wächst auf PEMBA-Agar nach 48 stündiger Inkubation bei 30°C deutlich grün-blau und ist aufgrund der charakteristischen Färbung relativ leicht zu identifizieren.
Die verdächtigen Kolonien wurden auf CASO-Agar isoliert und für 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Diese Isolate wurden für die DNA-Isolierung verwendet.
Alle Isolate wurden vor der molekularbiologischen Bearbeitung mittels Methylenblaufärbung auf Morphologie kontrolliert und als Stäbchen verifiziert.

Durchführung

- Vorbereiten einer Zellsuspension mit steriler 0,85% iger Kochsalzlösung (0,5-1,5 x 10^9 Zellen)
- 500 µl Zellsuspension in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen (auf Eis arbeiten)
- Zentrifugation für 5 sec bei 13.000 - 16.000 x g
- Überstand vorsichtig abziehen und 300 µl Zellsuspensionslösung dazu pipettieren, durch Auf- und Abpipettieren mischen
- 1,5 µl Lytic Enzyme Lösung dazu geben und 25 x durch Invertieren mischen
- Inkubation bei 37°C für 30 min im Heizblock
- Zentrifugation für 1 min bei 13.000- 16.000 x g
- Überstand vorsichtig abziehen und 300 µl Zelllysis Lösung dazu pipettieren, durch Auf- und Abpipettieren mischen
- Inkubation bei 80°C für 5 min im Wasserbad
- 1,5 µl RNAse A Lösung dazu geben und 25 x durch Invertieren mischen

- Inkubation bei 37°C für 15- 60 min im Heizblock
- Inkubation bei 4°C für 1 min im Kühlschrank oder auf Eis
- 100 µl Protein Präzipitationslösung dazu pipettieren und 20 sec auf Maximum vortexen
- Inkubation bei 4°C für 15- 60 min
- Zentrifugation für 3 min bei 13.000- 16.000 x g (→ im Überstand ist DNA)
- 300 µl 100% iges Isopropanol in steriles frisches Reaktionsgefäß vorlegen
- Überstand dazu pipettieren und 25- 50 x durch Invertieren mischen
- Zentrifugation für 1 min bei 13.000- 16.000 x g (→ Pellet ist DNA)
- Überstand vorsichtig abziehen und restliches Isopropanol durch Abtropfen der Probe auf Löschpapier entfernen
- 300 µl 70% iges Ethanol dazu und 25 x durch Invertieren mischen
- Zentrifugation für 1 min bei 13.000- 16.000 x g
- Überstand vorsichtig abziehen, restliches Ethanol durch Abtropfen der Probe auf Löschpapier entfernen und im Abzug für 15 min bei Raumtemperatur trocknen lassen
- 100 µl DNA Hydration Lösung dazu pipettieren und 5 sec auf Maximum vortexen
- Inkubation bei 65°C für 60 min im Wasserbad
- Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht unter leichtem Schütteln
- DNA bis zum PCR-Ansatz kurzfristig bei 4°C, langfristig bei -20°C aufbewahren

Verwendete Kontroll-Typstämme

Folgende *Bacillus cereus*-Typstämme wurden als positive Kontrollstämme mitgeführt:

- LMG 6923 = ATCC 14579/ DSM 31 (Bc 57)
- LMG 8221 = ATCC 11778/ DSM 345 (Bc 58)
- LMG 12394 (Bc 59)

2.3.2. Polymerase Kettenreaktion

Verwendete Primer

Tabelle 3: Primer für *Bacillus cereus* Gruppe

Primer	Basensequenz 5`--3`	Amplikon-größe	Zielgen	Literatur
BCGSH-1F	GTGCGAACCCAATGGGTCTTC	400 bp	groEL	Park 2007
BCGSH-1R	CCTTGTTGTACCACTTGCTC			
Ba1F	TGCAACTGTATTAGCACAAGCT	533 bp	groEL	Chang 2003
Ba1R	TACCACGAAGTTTGTTCACTACT			

Tabelle 4: Primer für *Bacillus cereus*

Primer	Basensequenz 5`--3`	Amplikon-größe	Zielgen	Literatur
BC1	ATTCGTGACACCGATCAAACA	365 bp	gyrB	Yamada 1999
BC2r	TCATACGTATGGATGTTATTC			
BCJH-F	TCATGAAGAGCCTGTGTACG	475 bp	gyrB	Park 2007
BCJH-1R	CGACGTGTCAATTCACGCGC			

Die Primer wurden entsprechend des Oligo-Syntheseberichts auf 100 pmol/µl mit UHQ-Wasser unter sterilen Bedingungen gelöst und danach die Arbeitsverdünnung hergestellt.

Arbeitsverdünnungen der verwendeten Primer

- BCJH-1R und BCJH-F: Verdünnung mit UHQ-Wasser auf 1:20
- BC2r und BC1 : Verdünnung mit UHQ-Wasser auf 1:10
- BCGSH-1F und BCGSH-1R : Verdünnung mit UHQ-Wasser auf 1:20
- Ba1F und Ba1R : Verdünnung mit UHQ-Wasser auf 1:10

Verwendeter Mastermix

Rekombinant thermostabile DNA Polymerase (1U)

10 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C)

1,5 mM $MgCl_2$

50 mM KCl

01 % Triton^R X- 100

Durchführung der PCR

- Proben, Mastermix und Primer im Kühlschrank auftauen
- PCR-Programme im Cycler einprogrammieren
- PCR-Ansatz für 1 Probe:

  22,5 µl Mastermix

  1 µl Primer Forward

  1 µl Primer Reverse

  + 0,5 µl DNA
- In steriles PCR-Reaktionsgefäß pipettieren
- PCR starten

PCR-Programme

Tabelle 5: Protokoll für *Bacillus cereus* Gruppe-PCR nach Chang (2003)

	Temperatur	**Dauer**
Initiationsphase	94°C	5 min
Aufschmelzen	94°C	30 sec
Hybridisierung	50°C	30 sec
Verlängerung	72°C	60 sec, 35 Zyklen
Endphase	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

Tabelle 6: Protokoll für *Bacillus cereus*-PCR nach Yamada (1999)

	Temperatur	**Dauer**
Initiationsphase	94°C	5 min
Aufschmelzen	94°C	30 sec
Hybridisierung	50°C	60 sec
Verlängerung	72°C	60 sec, 30 Zyklen
Endphase	72°C	7 min
Kühlen	4°C	

Tabelle 7: Protokoll für *Bacillus cereus* Gruppe-und *Bacillus cereus*-PCR nach Park (2007)

	Temperatur	**Dauer**
Initiationsphase	94°C	5 min
Aufschmelzen	94°C	30 sec
Hybridisierung	50°C	30 sec
Verlängerung	72°C	60 sec, 35 Zyklen
Endphase	72°C	5 min
Kühlen	4°C	

Nach Ablauf der PCR wurden die Amplifikate mit 6 µl Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird für die Auftrennung von DNA-Fragmenten von 100 bis 2000 Basenpaaren verwendet.

Lösungen

5x TBE-Puffer:

54 g Tris

27,5 g Borsäure

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

In UHQ- Wasser lösen und auf 1 l auffüllen, autoklavieren bei 121°C für 15 min.

0,5x TBE-Puffer-Gebrauchslösung (Laufpuffer):

100 ml 5x TBE-Puffer

900 ml UHQ-Wasser

2% Agarose:

0,6 g/ 1,8 g/ 4 g Agarose

30 ml/ 90 ml/ 200 ml 0,5x TBE-Puffer

100 bp-DNA-Marker (0,083 µg/ µl):

50 µl Stocklösung (1 µg/ µl)

450 µl UHQ-Wasser

Durchführung

- Je nach erforderlicher Größe des Gels wurde die entsprechende Menge an 2% iger Agarose-Lösung hergestellt, in der Mikrowelle aufgeschmolzen, nach Abkühlen auf 50°C in den Gelträger gegossen und die Kämme eingesetzt. Nach einer Stunde Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer bedeckt.
- Probenvorbereitung: Zu den PCR- Produkten wurde jeweils 6 µl Gelladepuffer pipettiert, gemischt und kurz zentrifugiert.
- Auftragen von 6 µl Probelösung und 4 µl Marker in entsprechende Gelvertiefungen
- Auftrennung der DNA- Fragmente erfolgte je nach Größe des Gels bei 80 V für 45 min, 130 V für 1 Stunde oder 210 V für 1, 5 Stunden.
- Färbung der aufgetrennten Amplifikate mittels Ethidiumbromid
- Darstellung mittels UV-Transilluminator

3. Ergebnisse

3.1. Mikrobiologische Ergebnisse

Die zu untersuchenden Arzneipflanzen-Proben wurden nach entsprechender Anleitung im Doppelansatz in den Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-5} angesetzt und nach vorgeschriebener Inkubation (siehe Kapitel 2.2 „Mikrobiologische Methoden“) ausgewertet. Die untersuchten Kräuter sind in Tabelle 1 aufgelistet, wobei die aus Österreich bezogenen Proben mit „AT1“ bis „AT29“ und die direkt aus China importierten Proben mit „CH1“ bis „CH55“ gekennzeichnet sind.

In den folgenden Diagrammen sind die Auswertungen der einzelnen mikrobiologischen Parameter gesondert angeführt. Die Nachweisgrenze der einzelnen Mikroorganismen ist durch die höchstmögliche eingesetzte Verdünnungsstufe (10^{-1}) definiert, das heißt die in den Diagrammen mit KBE/g [log 10] von 0 bewerteten Proben wiesen bei der Verdünnung 10^{-1} kein Wachstum auf. Ein Einsetzen von unverdünnter Probe war aufgrund der Probenbeschaffenheit nicht möglich. Die Bearbeitung der getrockneten Arzneipflanzen konnte erst nach entsprechender Probenvorbereitung (siehe Kapitel 2.2 „Mikrobiologische Methoden“) und der daraus resultierenden Verdünnung von 10^{-1} durchgeführt werden.

Die mikrobiologischen Untersuchungen orientierten sich an den Vorgaben der Europäischen Pharmakopoe, 2007 (siehe Tabelle 8) und an den empfohlenen Richtwerten der EHIA, 2008 (siehe Tabelle 9).

Tabelle 8: Grenzwerte der mikrobiellen Qualität pharmazeutischer Zubereitungen gemäß Europäischer Pharmakopoe, 2007

Zubereitung	**Kategorie**	**Keime**	**Keimzahl**
Pflanzliche Arzneimittel, denen vor der Anwendung siedendes Wasser zugesetzt wird	4 A	Aerob wachsende Bakterien Hefen und Schimmelpilze *Escherichia coli*	max. 10^7 KBE/g (ml) max. 10^5 KBE/g (ml) max. 10^2 KBE/g (ml)
Andere pflanzliche Arzneimittel	4 B	Aerob wachsende Bakterien Hefen und Schimmelpilze *Escherichia coli* Enterobakterien Salmonellen	max. 10^5 KBE/g (ml) max. 10^3 KBE/g (ml) keine /g (ml) max. 10^3 KBE/g (ml) keine /g (ml)

Tabelle 9: Empfohlene mikrobiologische Spezifikation für den Handel mit Rohmaterial zur Herstellung von teeähnlichen Erzeugnissen gemäß EHIA, 2008, Kapitel VII

Keime	**Keimzahl**
Aerobe Keimzahl	max. 1 x 10^8 KBE/g (ml)
Hefen	max. 1 x 10^6 KBE/g (ml)
Schimmelpilze	max. 1 x 10^6 KBE/g (ml)
Escherichia coli	max. 1 x 10^4 KBE/g (ml)
Salmonellen	nicht nachweisbar in 125g

3.1.1. Ergebnisse bezogen auf mikrobiologische Parameter

Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Alle angewachsenen Keime auf dem Plate Count-Nährboden wurden ausgezählt.
Ab einer Keimzahl über 150 Kolonien pro Platte wurde das Ergebnis mit „>150 KBE“ angegeben.

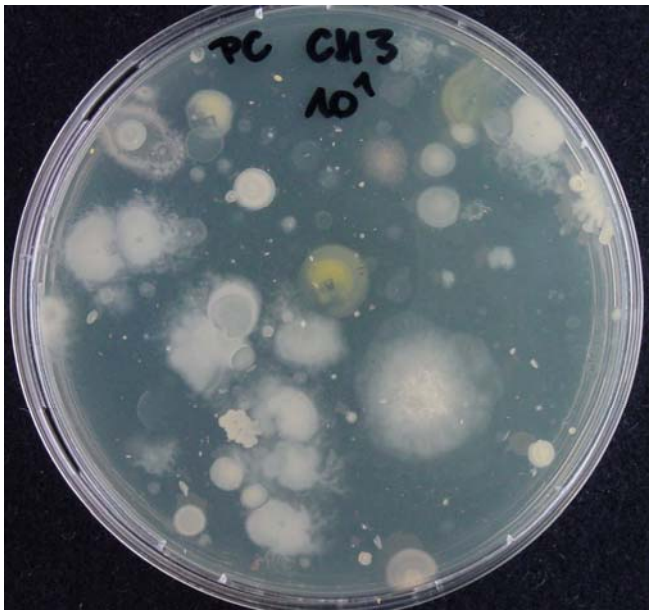

Abbildung 55: Keimwachstum auf Plate Count-Agar

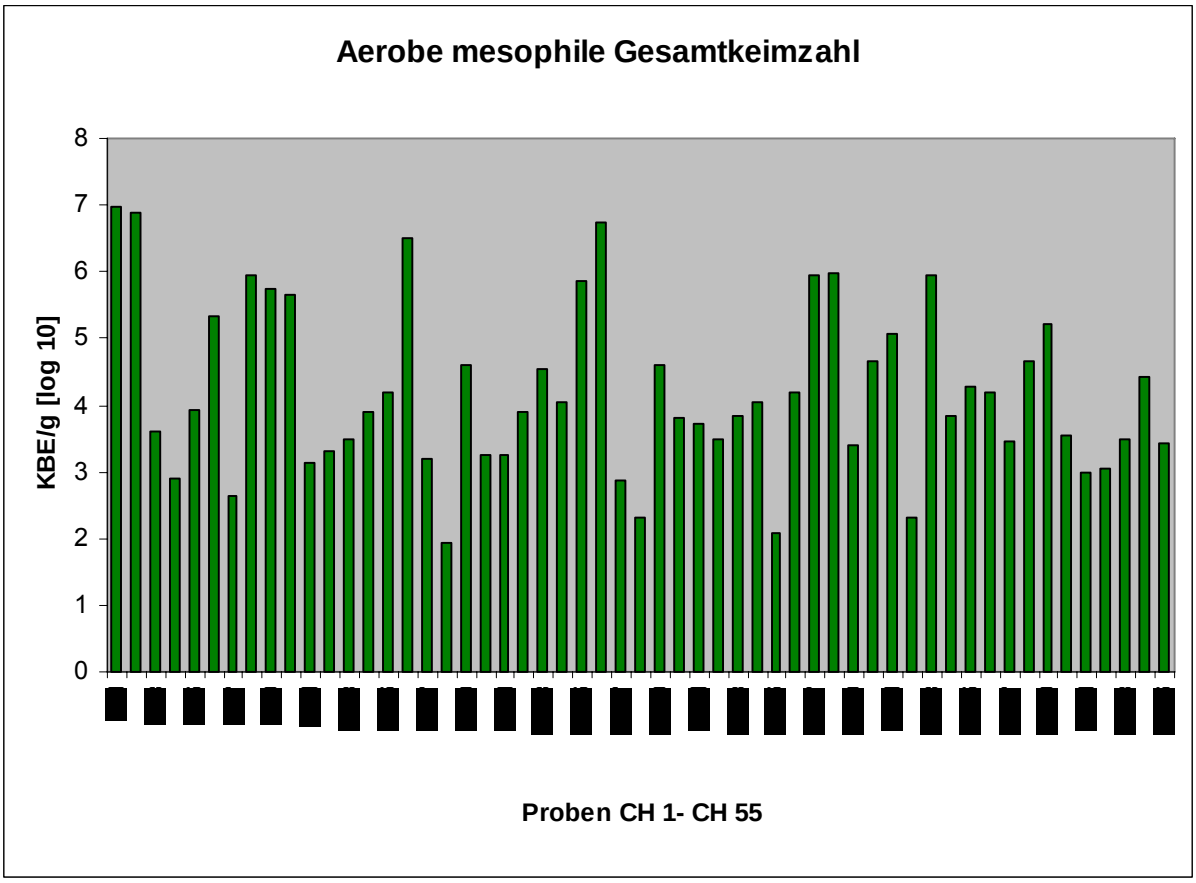

Abbildung 56a: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (Proben aus China)

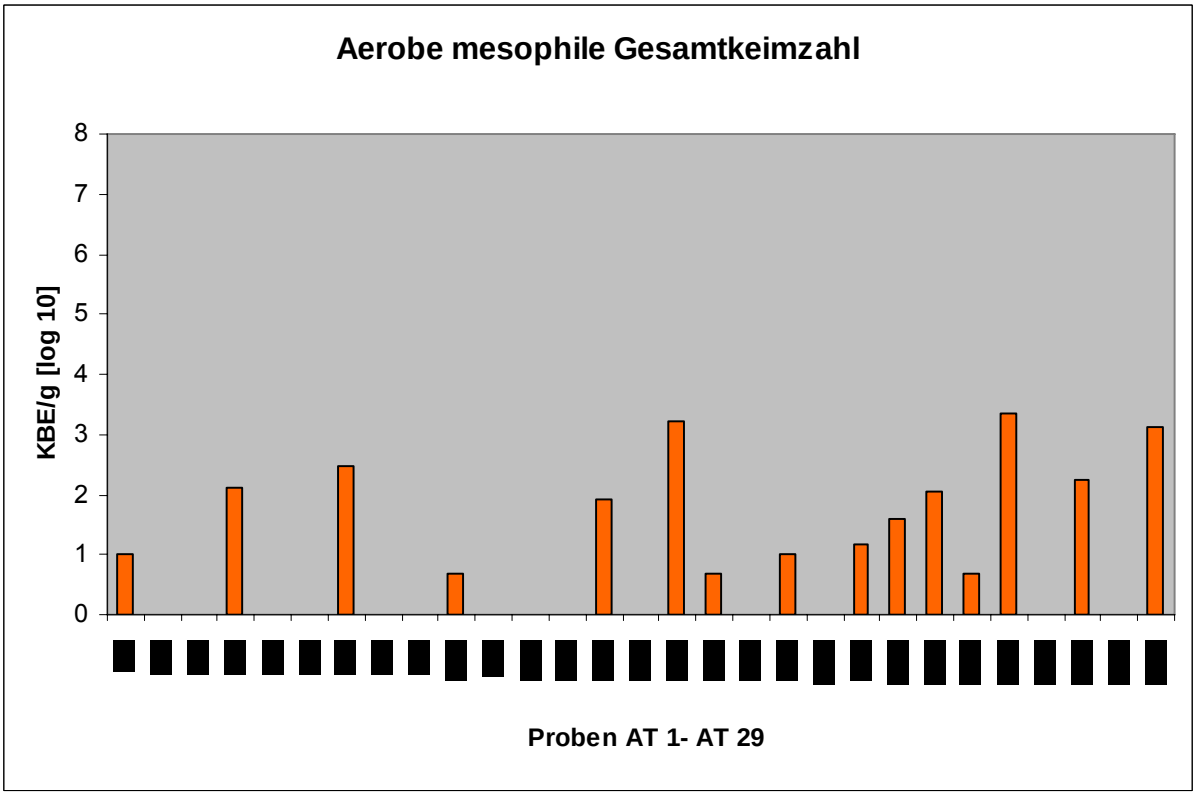

Abbildung 56b: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (Proben aus Österreich)

Hefe-und Schimmelpilze

Auf dem verwendeten selektiven Nährmedium YGC-Agar wachsen nur Schimmelpilze und Hefen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Wachstumsmorphologie ist eine Unterscheidung leicht möglich. Eine Keimzahl über 150 Kolonien pro Platte wurde mit „>150 KBE“ beurteilt.

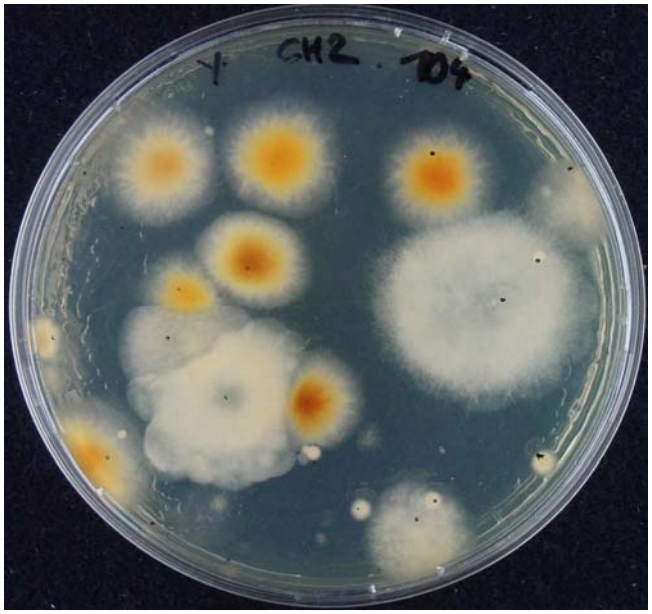

Abbildung 57: Keimwachstum auf YGC-Agar

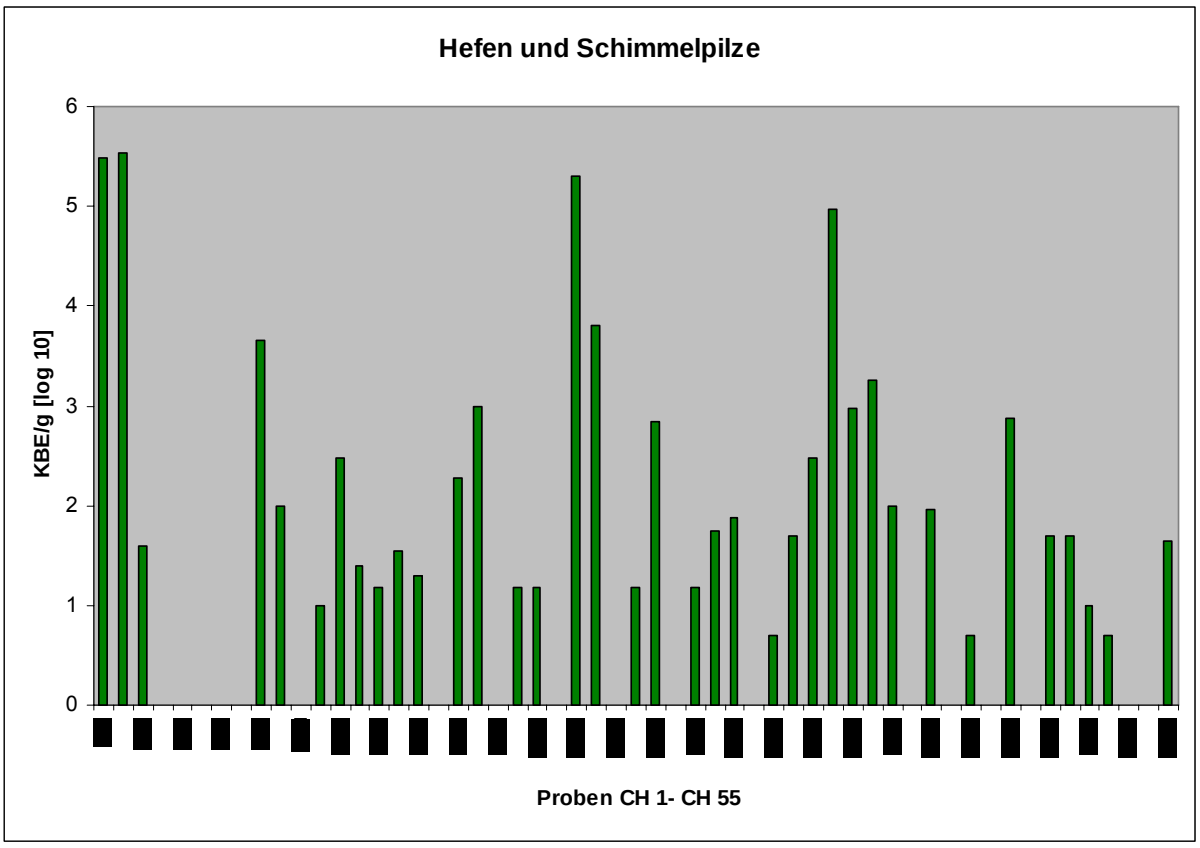

Abbildung 58a: Keimzahl der Hefen und Schimmelpilze (Proben aus China)

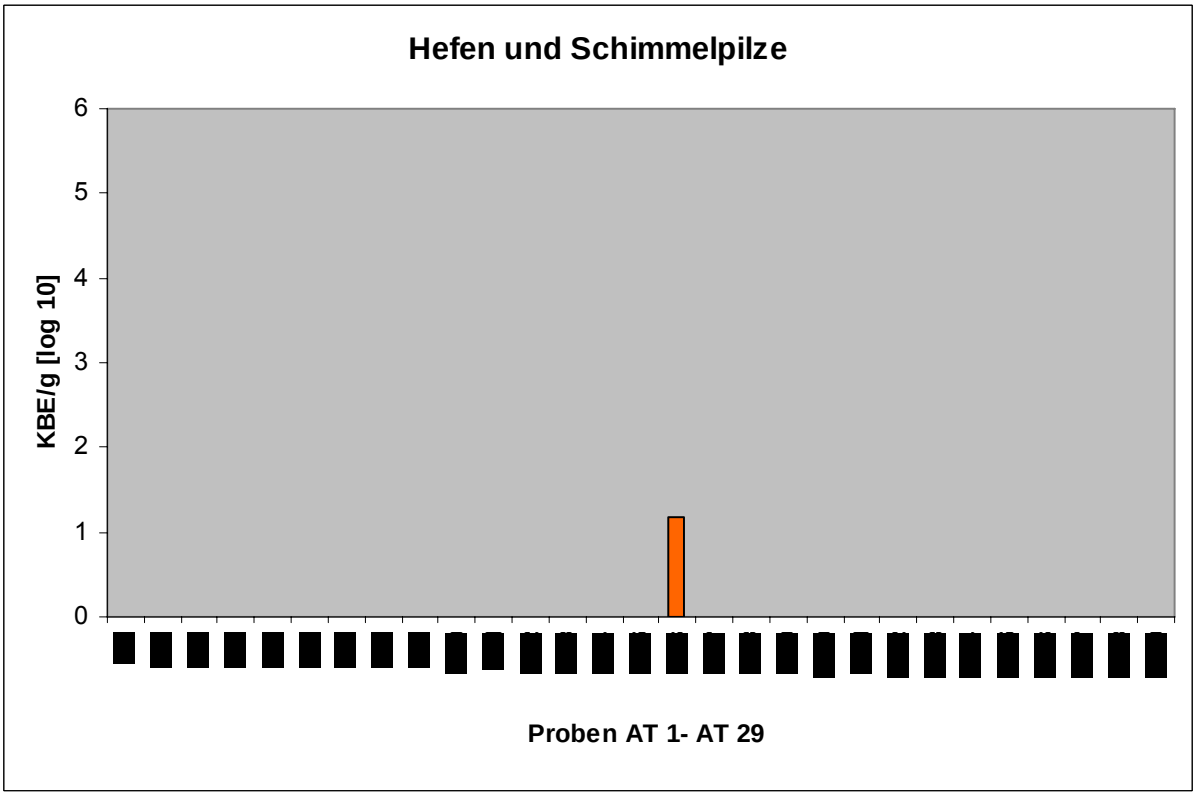

Abbildung 58b: Keimzahl der Hefen und Schimmelpilze (Proben aus Österreich)

Enterobakterien

Die Isolierung von Enterobakterien wurde auf VRBD-Agar durchgeführt. Säurebildung aus Glucose, ein Definitionsmerkmal der Enterobakterien, wird durch Rotfärbung der Kolonien und Gallensäurepräzipitation um die Kolonien angezeigt. Wachstum von Begleitflora wird durch den Zusatz von Kristallviolett und Gallensalze gehemmt. Verdächtige Kolonien wurden ausgezählt, ab einer Keimzahl über 150 Kolonien pro Platte wurde das Ergebnis mit „ > 150 KBE“ angegeben.

Purpur-rote Kolonien deuten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Enterobakterien hin.

Eine Bestätigung erfolgte durch Isolierung verdächtiger Kolonien auf Nutrientagar und anschließender Oxidase-und Fermentationstestung.

Oxidase-negative und Glucose-positive Kolonien wurden als Enterobakterien bewertet.

Abbildung 59: Keimwachstum auf VRBD-Agar

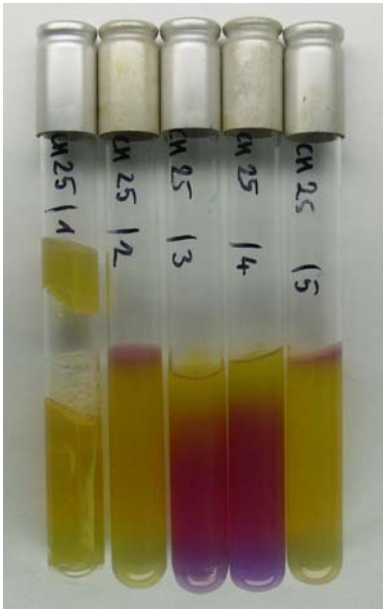

Abbildung 60: Fermentationstest

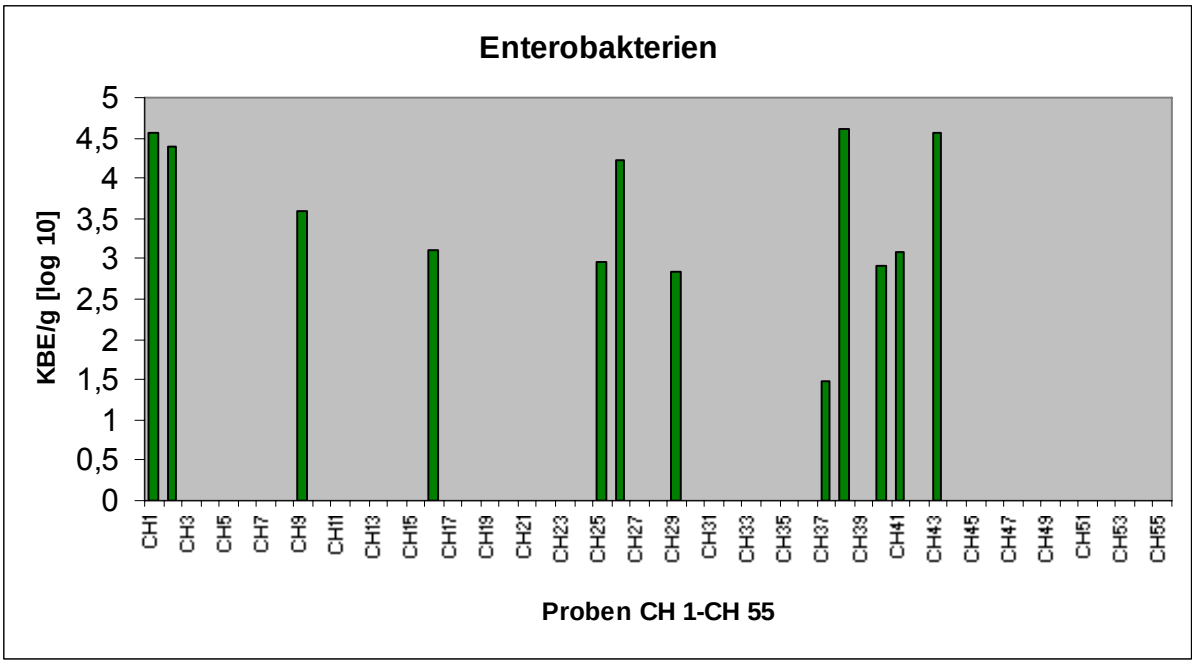

Abbildung 61: Keimzahl der Enterobakterien (Proben aus China)

In den österreichischen Proben AT1-AT29 konnten in der Verdünnung 10^{-1} keine Enterobakterien nachgewiesen werden.

Enterokokken

Die Kultivierung der Proben auf Enterokokken erfolgte auf Enterococcosel-Agar. Die Kombination von Gallensäure und Äsculin ermöglicht eine Selektion und Differenzierung der Lancefield-Gruppe D-Streptokokken. Durch Äsculin-Hydrolyse, ein Definitionsmerkmal der Enterokokken, kommt es zur Schwarzfärbung des Nährbodens und erlaubt ein Auszählen typischer Kolonien. Ab einer Keimzahl über 150 Kolonien pro Platte wurde das Ergebnis mit „ > 150 KBE“ angegeben.

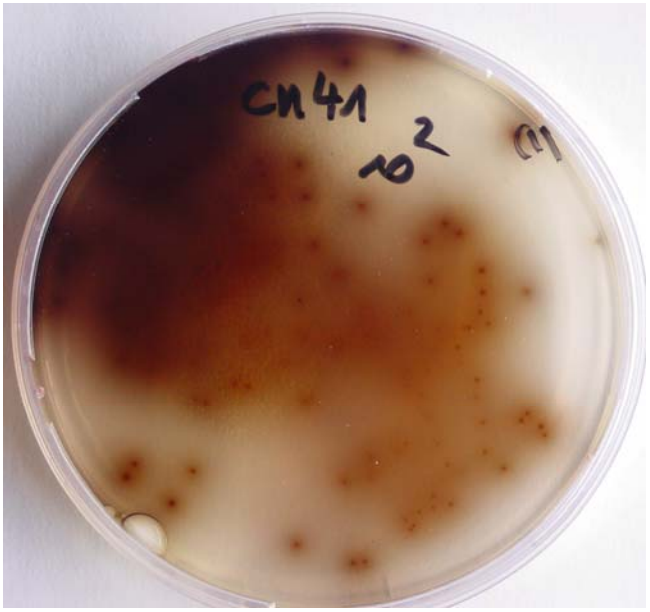

Abbildung 62: Keimwachstum auf Enterococcosel

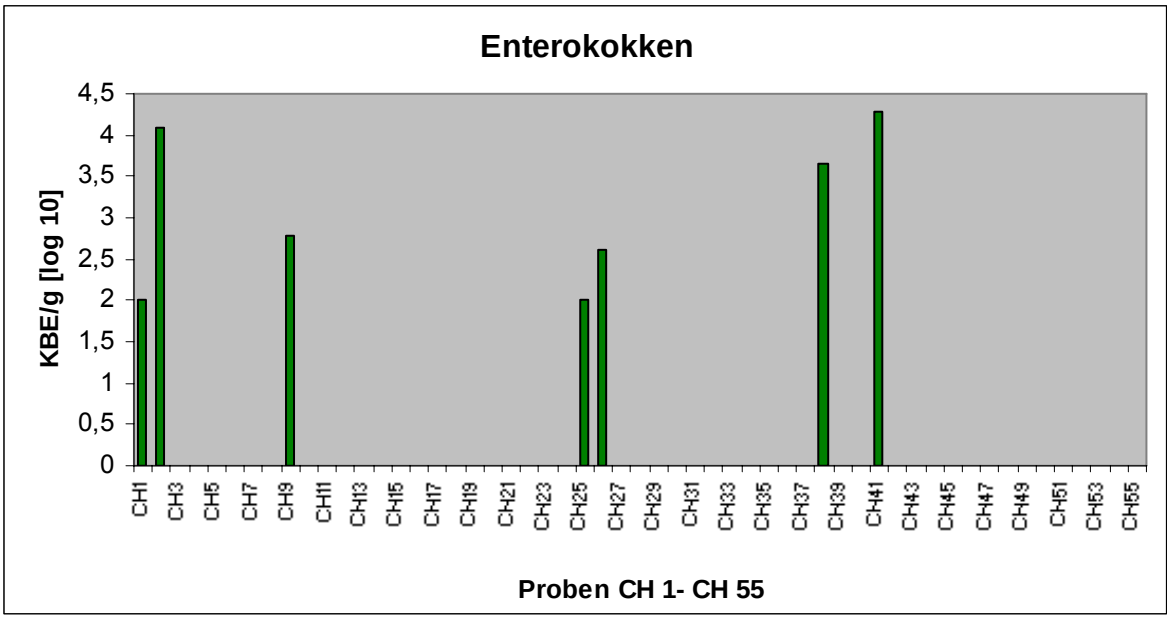

Abbildung 63: Keimzahl der Enterokokken (Proben aus China)

In den österreichischen Proben AT1-AT29 konnten in der Verdünnung 10^{-1} keine Enterokokken nachgewiesen werden.

Laktobazillen

Zur Kultivierung der Laktobazillen wurde der MRS-Agar verwendet. Dieser Nährboden enthält neben einer sehr guten Nährstoffbasis aus Pepton, Fleisch- und Hefeextrakt, sowie Glucose als wichtige C-Quelle, alle für das Wachstum der Laktobazillen notwendigen Wachstumsfaktoren. Durch den hohen Glucosegehalt zusammen mit Ammoniumcitrat und dem niedrigen pH-Wert wird das Wachstum der bakteriellen Begleitflora gehemmt. Die Laktobazillen wachsen als typisch weißliche, glänzend oder matte Kolonien.

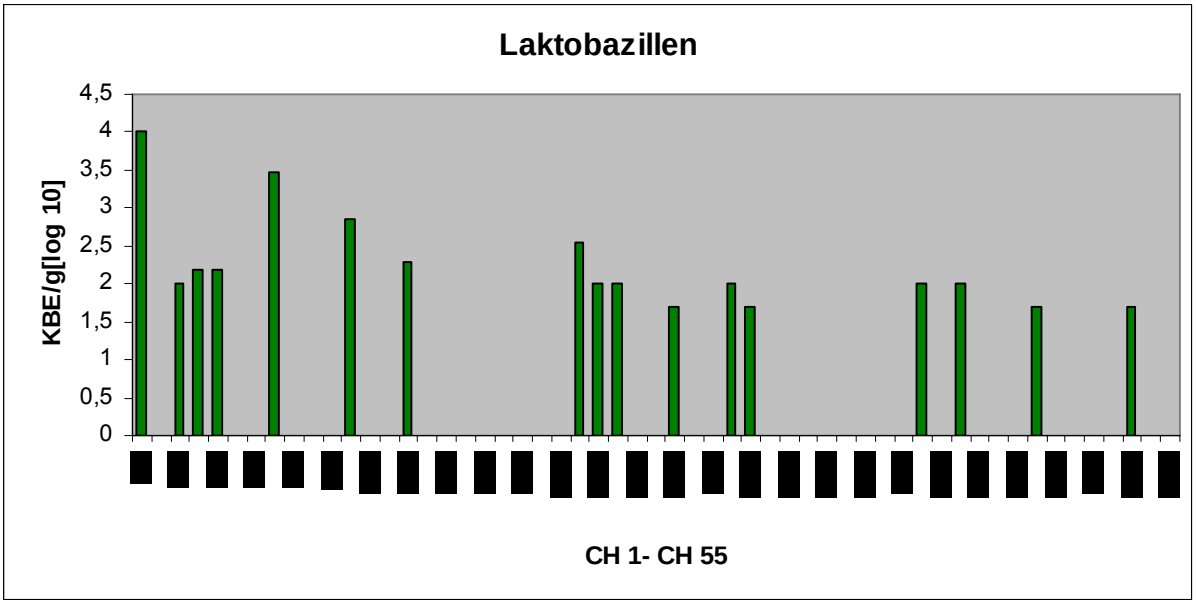

Abbildung 64: Keimzahl der Laktobazillen (Proben aus China)

In den österreichischen Proben AT1-AT29 konnten in der Verdünnung 10^{-1} keine Lactobazillen nachgewiesen werden.

Koagulase-positive Staphylokokken

Die Isolierung von Staphylokokken erfolgte am Baird-Parker-Agar, ein Staphylokokken-Selektivagar. Er enthält Lithiumchlorid und Tellurit zur Hemmung der Begleitflora, während Pyruvat und Glycin auf Staphylokokken selektiv wachstumsfördernd wirken. Die Staphylokokken-Kolonien zeigen auf diesem Nährboden zwei diagnostische Charakteristika: Eine durch Lipolyse und Proteolyse verursachte Hof-und Ringbildung um die Kolonien und eine Schwarzfärbung durch Reduktion von Tellurit zu Tellur.

Eine Keimzahl über 150 Kolonien pro Platte wurde mit „>150 KBE“ beurteilt.

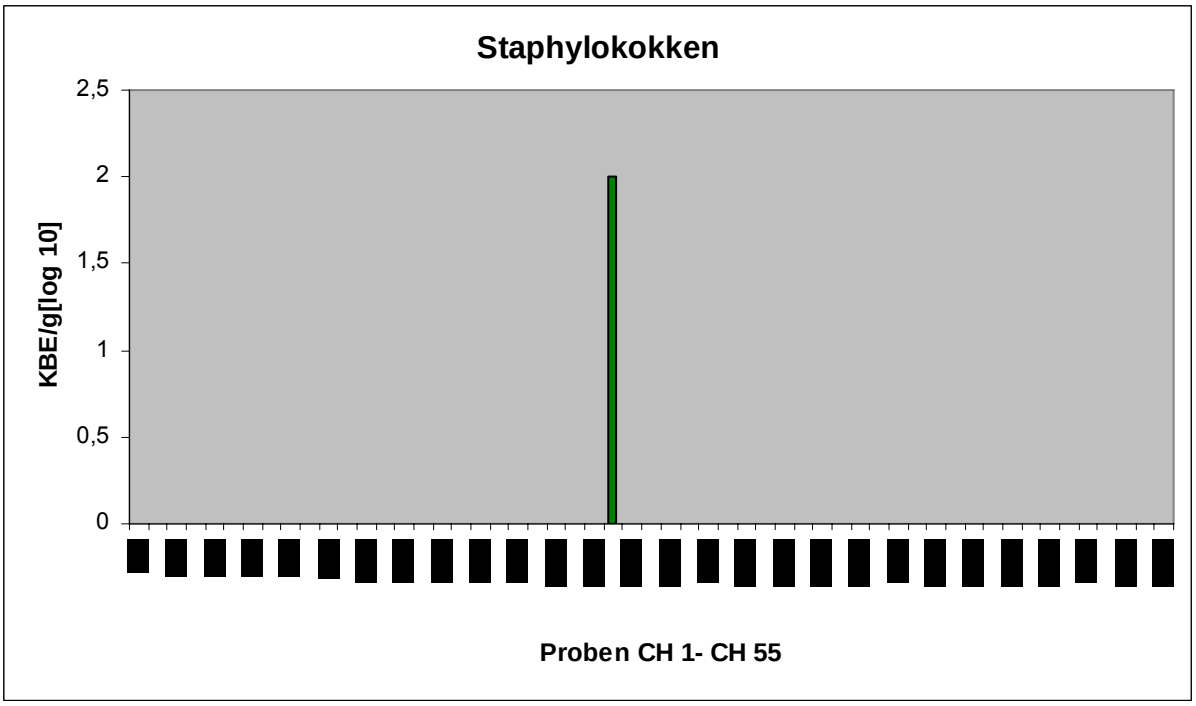

Abbildung 65: Keimzahl der koagulase-positiven Staphylokokken (Proben aus China)

In den österreichischen Proben AT1-AT29 konnten in der Verdünnung 10^{-1} keine koagulase- positiven Staphylokokken nachgewiesen werden.

Anaerobe Sporenbildner

Zum Nachweis der anaeroben Sporenbildner wurde DRCM-Agar verwendet. Der Nährboden ist nicht selektiv, neben sporenbildenden Anaerobiern können auch Laktobazillen und Streptokokken wachsen. Um dem entgegen zu wirken, wurden die Proben einer Laborpasteurisation unterzogen (80°C für 10 Minuten). Das Erhitzen führt zum Abtöten der vegetativen Begleitkeime und nur Clostridien wachsen bei anaerober Bebrütung als schwarze, sulfitreduzierende Kolonien.

Abbildung 66: Keimwachstum auf DRCM-Agar

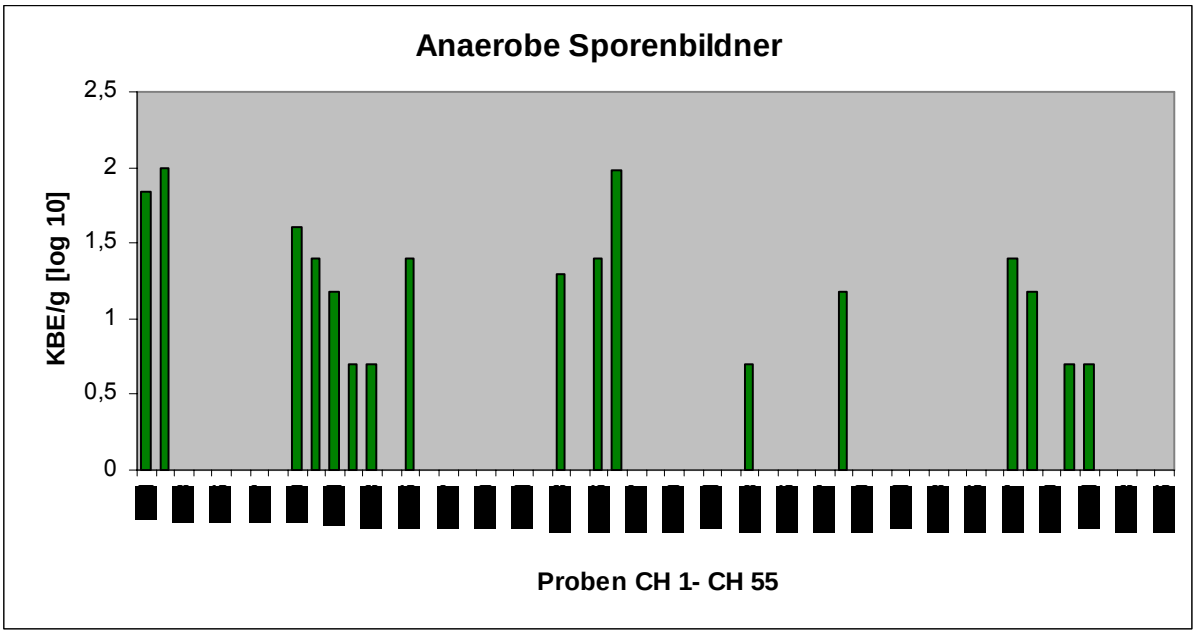

Abbildung 67: Keimzahl der anaeroben Sporenbildner (Proben aus China)

In den österreichischen Proben AT1-AT29 konnten in der Verdünnung 10^{-1} keine anaeroben Sporenbildner nachgewiesen werden.

Aerobe Sporenbildner

Die Kultivierung von aeroben Sporenbildnern erfolgte auf CASO-und auf PEMBA-Agar. Das Wachstum der Bakterien wird durch die im CASO-Nährboden enthaltenen essentiellen Aminosäuren, niedermolekularen Peptiden und löslichen Proteinen aus Caseinpepton und Sojamehlpepton gefördert. Der CASO-Agar gilt als Universalnährboden mit breiter Anwendung zur Anzüchtung anspruchsvoller Keime.

PEMBA-Agar wurde zur Kultivierung von *Bacillus* Arten verwendet. Dieser Selektivnährboden macht eine leichte Identifizierung aufgrund des typischen Wachstums der Kolonien in blau-türkiser Färbung möglich.

Ab einer Keimzahl über 150 Kolonien pro Platte wurde das Ergebnis mit „>150 KBE“ angegeben.

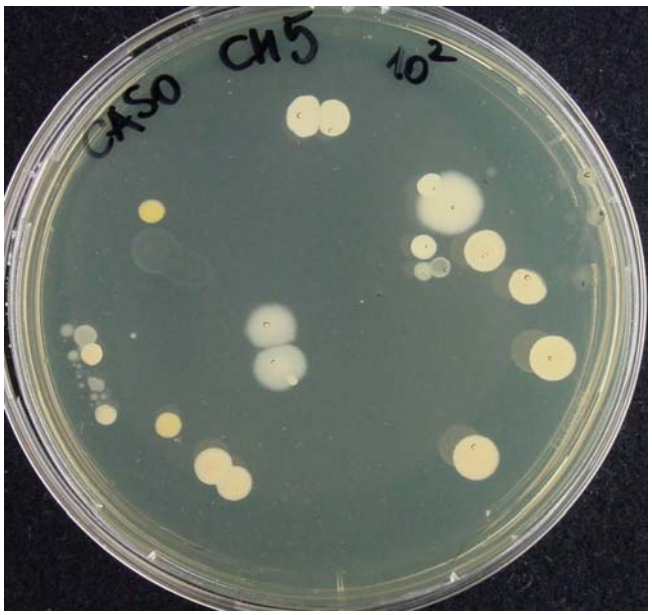

Abbildung 68: Keimwachstum auf CASO-Agar

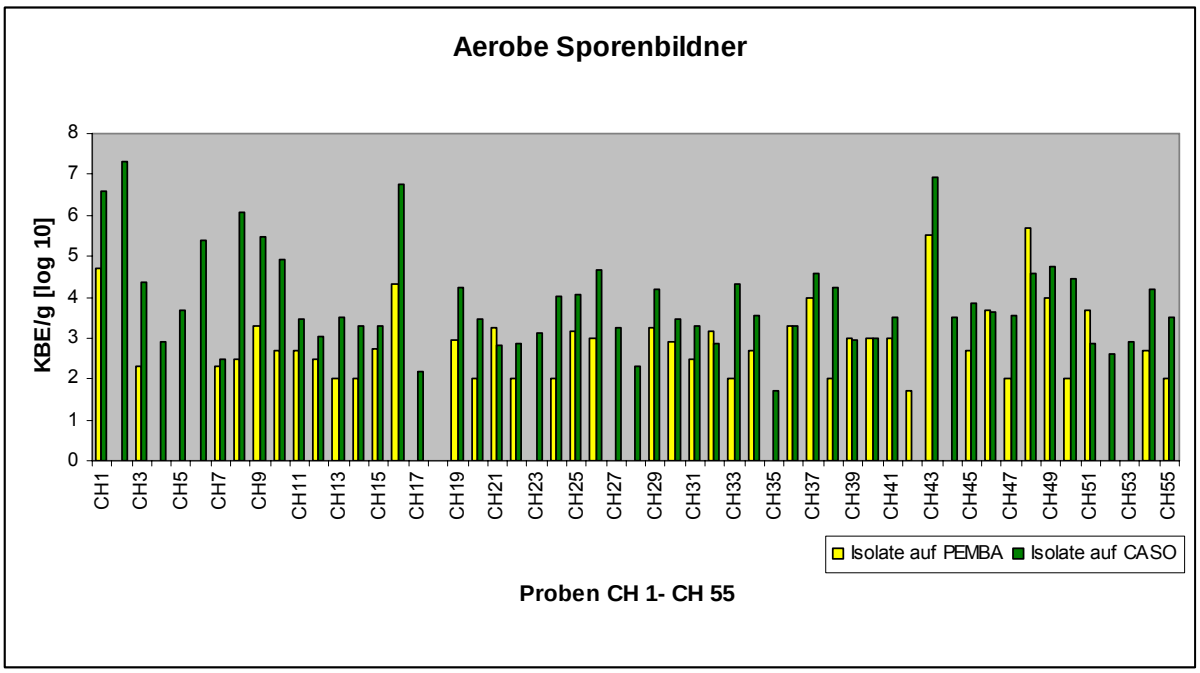

Abbildung 69a: Keimzahl der aeroben Sporenbildner (Proben aus China)

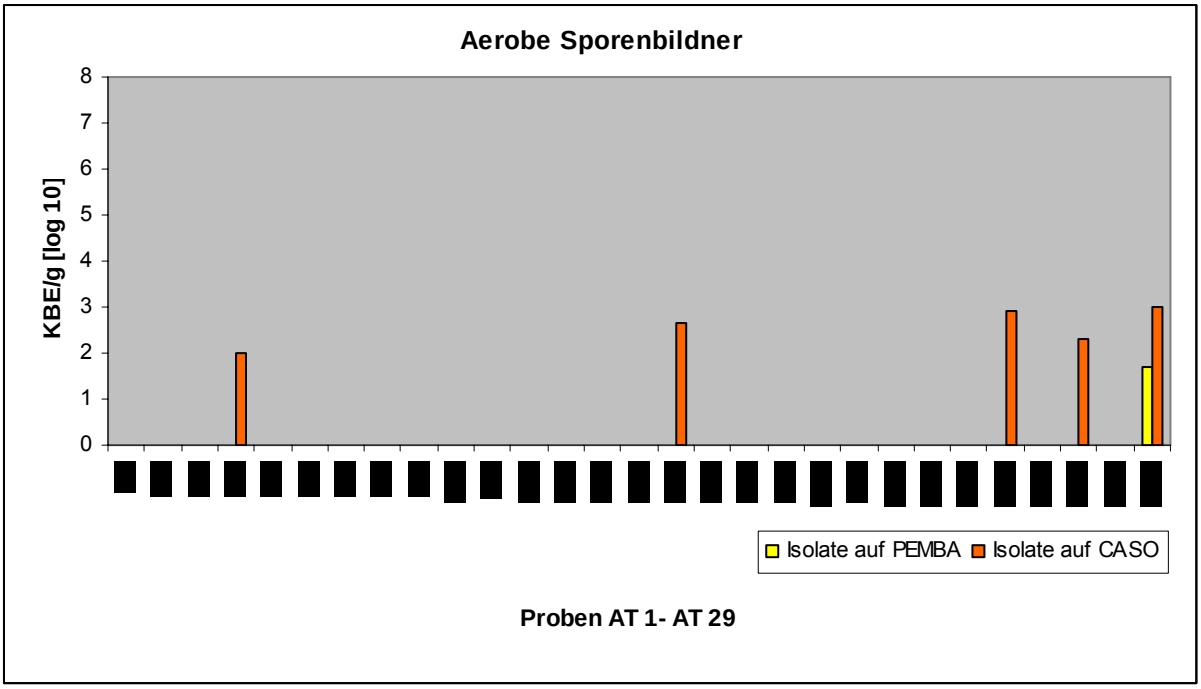

Abbildung 69b: Keimzahl der aeroben Sporenbildner (Proben aus Österreich)

3.1.2. Ergebnisse bezogen auf die Art der Arzneipflanze

Da die mikrobielle Belastung von den Eigenschaften der Arzneipflanzen abhängig ist (siehe Kapitel 1), erscheint es sinnvoll, die Proben in Abhängigkeit vom Pflanzenorgan zu betrachten. Die Vielfalt der Pflanzenorgane beinhaltet Samen, Früchte, Zweige, Blätter, Blüten und Wurzeln.
Bei den insgesamt 84 untersuchten Arzneimitteln handelt es sich bei 55 Proben um Wurzeln, bei 9 Proben um Früchte, bei je 7 Proben um Blüten und Blätter und bei je 3 Proben um Zweige und Samen.

Das mengenmäßig größte Probenkollektiv „Wurzeln“ zeigt eine mikrobielle Belastung in 85,5% der Proben mit aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl-Werten bis 10^6 KBE/g (siehe Abbildung 70). In 70,9% der Wurzelproben konnten aerobe Sporenbildner mit Keimzahlen bis maximal 10^6 KBE/g nachgewiesen werden, in 38,2% waren Schimmelpilze, in 21,8% waren Laktobazillen und in weniger als 7,3% der Proben waren Enterobakterien, Enterokokken und Clostridien nachweisbar. In keiner der untersuchten Wurzelproben konnten koagulase-positive Staphylokokken nachgewiesen werden.

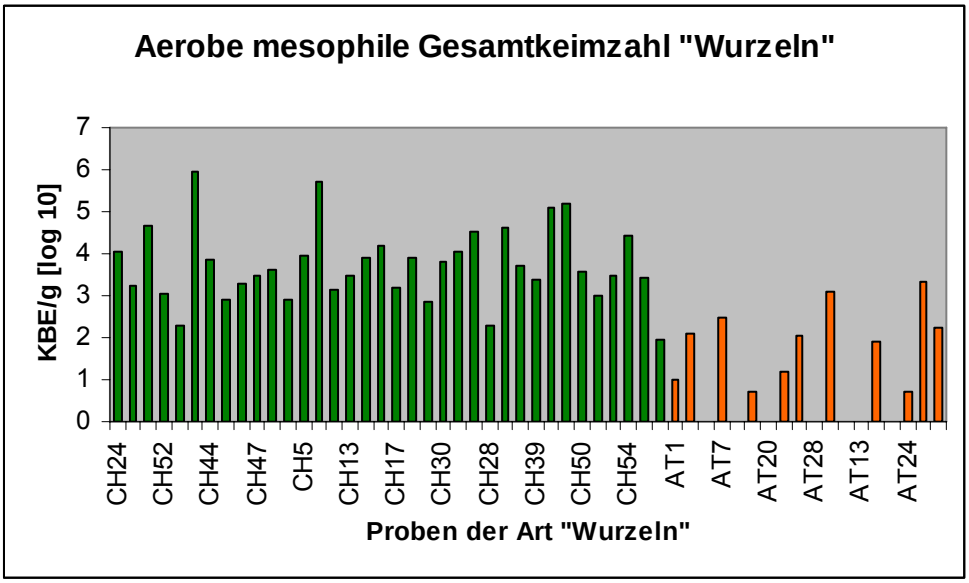

Abbildung 70: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Wurzeln“

Das Probenkollektiv „Samen“ umfasst 3 Proben. Die maximale aerobe Gesamtkeimzahl erreichte in diesem Kollektiv einen Wert nahe 10^6 KBE/g (siehe Abbildung 71), die Keimzahl für aerobe Sporenbildner lag etwas niedriger bei 10^4 KBE/g. Schimmelpilze konnten in 2 von 3 Proben mit Keimzahlen bis 10^4 KBE/g nachgewiesen werden. Enterobakterien konnten nur in einer Probe mit der Keimzahl von 10^4 KBE/g kultiviert werden. Ebenfalls in nur einer Samenprobe wurden Enterokokken mit 10^3 KBE/g und Laktobazillen mit 10^2 KBE/g nachgewiesen. In keiner der untersuchten Proben konnten koagulase-positive Staphylokokken nachgewiesen werden.

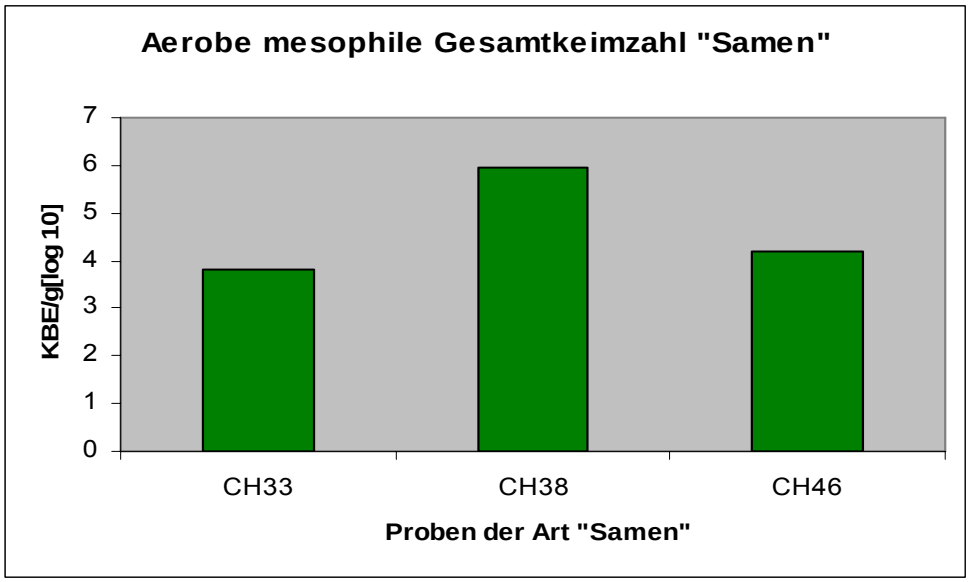

Abbildung 71: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Samen“

Die mengenmäßig gleich großen Gruppen “Blüten“ und „Blätter“ mit je 7 Proben erreichten maximale aerobe Gesamtkeimzahlwerte von über 10^6 KBE/g (siehe Abbildungen 72 und 73). In 85,7% der Blätter-Proben und in 71,4% der Blüten-Proben konnte eine mikrobielle Belastung festgestellt werden. Auch in diesen beiden Gruppen konnten aerobe Sporenbildner mit den höchsten Keimzahlen mit über 10^6 KBE/g nachgewiesen werden (Kollektiv „Blüten“ 57,1% positiv, Kollektiv „Blätter“ 71,4% positiv). Die detektierten Keimzahlen für Enterobakterien (bis 10^4 KBE/g) und für Schimmelpilze (bis 10^5 KBE/g) waren in beiden Gruppen gleich hoch. Von den 7 Blätter-Proben waren 3 Proben positiv im Nachweis von Laktobazillen und Enterokokken mit Keimzahlen bis zu 10^4 KBE/g, in ebenfalls 3 Proben konnten Clostridien mit Keimzahlen bis zu 10^2 KBE/g nachgewiesen werden. In einer Probe

der Blätter konnten koagulase-positive Staphylokokken mit einer Keimzahl von 10^2 KBE/g nachgewiesen werden.

Im Probenkollektiv „Blüten“ konnten Laktobazillen und Enterokokken mit Keimzahlen bis zu 10^2 KBE/g und Clostridien bis zu 10^1 KBE/g in 14,3% der Proben kultiviert werden. In keiner der untersuchten Blütenproben konnten koagulase-positive Staphylokokken nachgewiesen werden.

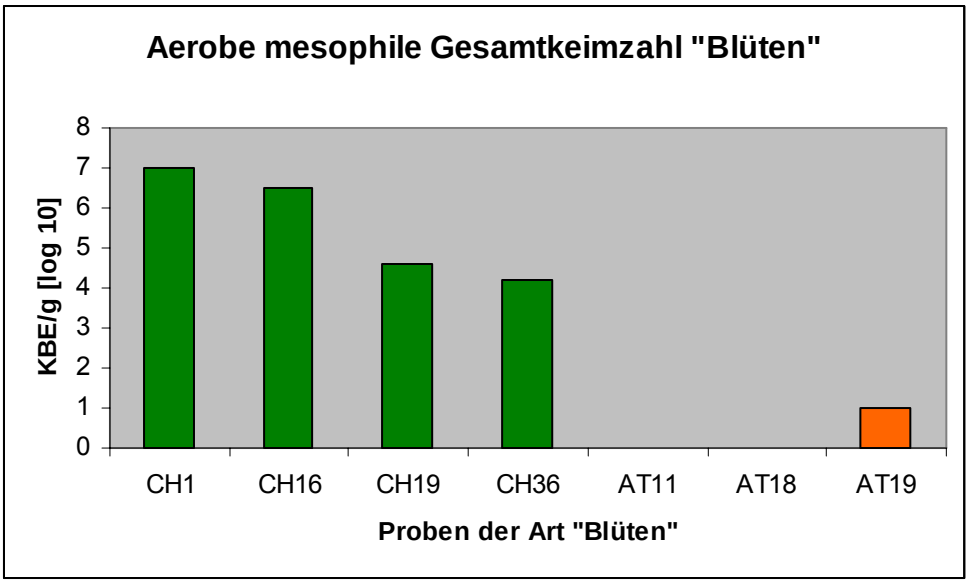

Abbildung 72: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Blüten“

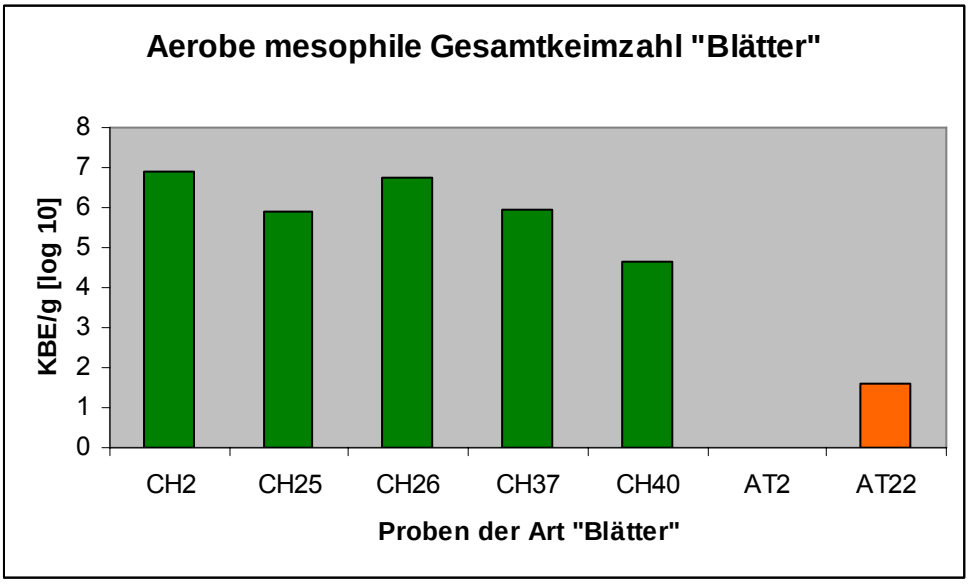

Abbildung 73: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Blätter“

Das zweitgrößte Kollektiv stellen die Früchte mit 9 Proben dar. Die nachgewiesenen Keimzahlen erreichten ebenfalls Maximalwerte bei der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl (siehe Abbildung 74) und bei den aeroben Sporenbildnern mit bis zu 10^6 KBE/g, wobei 66,7% der Proben positiv waren. In 44,5% der Früchte-Proben waren Schimmelpilze bis zu 10^2 KBE/g nachweisbar. In 2 der 9 Proben konnten Laktobazillen und in einer Probe konnten Clostridien kultiviert werden, wobei die Keimzahlen von 10^2 KBE/g nicht überschritten wurden. Die mikrobiologischen Parameter Enterobakterien, Enterokokken und koagulase-positive Staphylokokken konnten in keiner Probe aus dem Kollektiv „Früchte“ nachgewiesen werden.

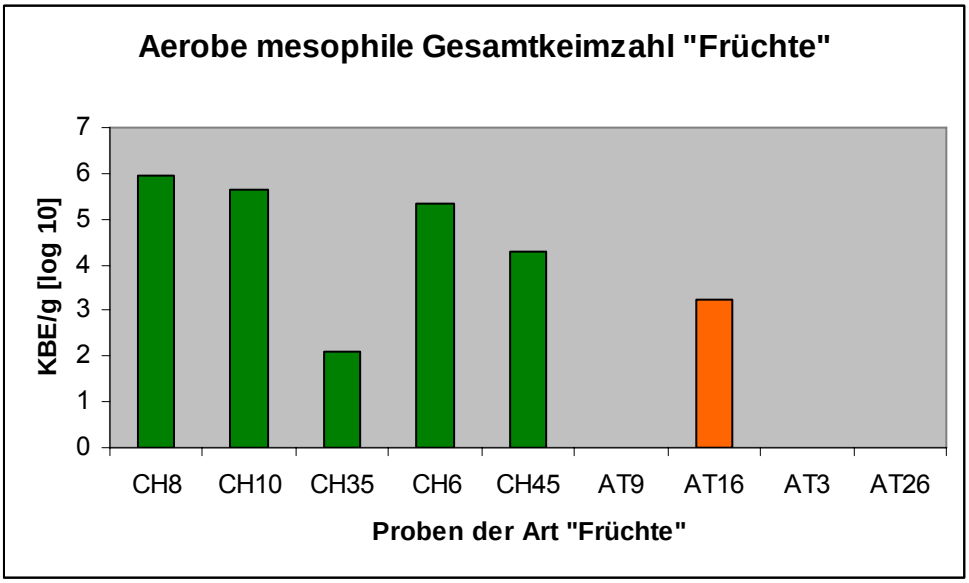

Abbildung 74: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Früchte“

Das Probenkollektiv „Zweige“ umfasst 3 Proben. Die Werte für die aerobe Gesamtkeimzahl lagen knapp über 10^3 KBE/g (siehe Abbildung 75), welche auch den Werten für aerobe Sporenbildner und Schimmelpilze entsprachen, wobei nur jeweils 2 von den 3 Proben positiv waren. Die mikrobiellen Parameter Enterokokken, Enterobakterien, Laktobazillen, koagulase-positive Staphylokokken und Clostridien konnten in keiner Probe der Zweige nachgewiesen werden.

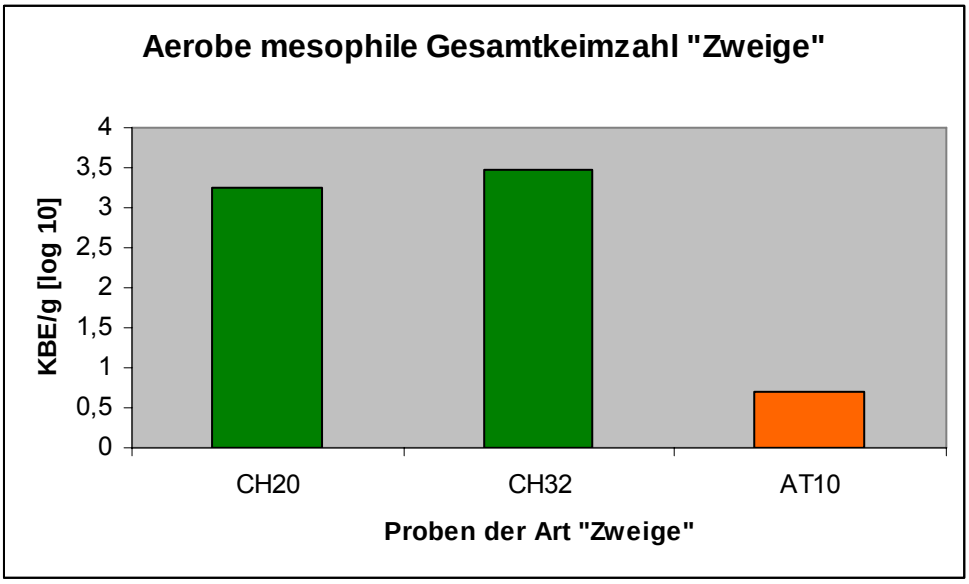

Abbildung 75: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Zweige“

3.1.3. Ergebnisse bezogen auf die Bezugsquelle der Arzneipflanzen

Von den insgesamt 84 untersuchten pflanzlichen Arzneistoffen sind 28 Proben nach Art der Arzneipflanze gleich (siehe Tabelle 8), sie unterscheiden sich jedoch durch ihre Bezugsquellen (Österreich/ China).

Tabelle 10: Auflistung der 28 gleichen Arzneipflanzen unterschiedlicher Bezugsquelle

Pflanzenbezeichnung	**Probennummer China**	**Probennummer Österreich**
Angelica dahuricae rx	CH12	AT1
Leonuri herba	CH25	AT2
Jujubae fructus	CH35	AT3
Chuangxiong rhz.	CH22	AT4
Poria	CH18	AT5
Glehniae rx.	CH15	AT6
Paenia alba rx.	CH7	AT7
Scrophulariae rx.	CH13	AT8
Gardeniae fructus	CH10	AT9
Lonicerae japon. flos	CH36	AT11
Astragali rx.	CH3	AT12
Isatidis rx.	CH5	AT13

Tabelle 10: Auflistung der 28 gleichen Arzneipflanzen unterschiedlicher Bezugsquelle (Fortsetzung)

Pflanzenbezeichnung	**Probennummer China**	**Probennummer Österreich**
Ophiopogonis rx.	CH30	AT14
Scutellariae rx.	CH27	AT15
Citri reticulatae pericarp.	CH8	AT16
Anemarrhenae rhz.	CH21	AT17
Magnoliae flos	CH19	AT18
Carthami flos	CH16	AT19
Cyperi rhz.	CH17	AT20
Alismatis rhz.	CH24	AT21
Artemisiae scopariae rx.	CH37	AT22
Bupleuri rx.	CH9	AT23
Salviae mit. rx. et rhz.	CH14	AT24
Rhemanniae rx.	CH23	AT25
Ligustri luc. fructus	CH6	AT26
Moutan cortex	CH4	AT27
Codonopsis rx.	CH11	AT28
Angelicae sinensis rx.	CH34	AT29

In den folgenden Diagrammen werden die Arzneipflanzen bezogen auf ihre Bezugsquelle dargestellt, um die unterschiedliche Herkunft und dessen Auswirkungen auf die Qualität der Drogen zu vergleichen. Aufgezeigt werden aerobe mesophile Gesamtkeimzahl und die Keimzahl der aeroben Sporenbildner kultiviert auf den beiden verwendeten Nährmedien CASO-Agar und PEMBA-Agar.

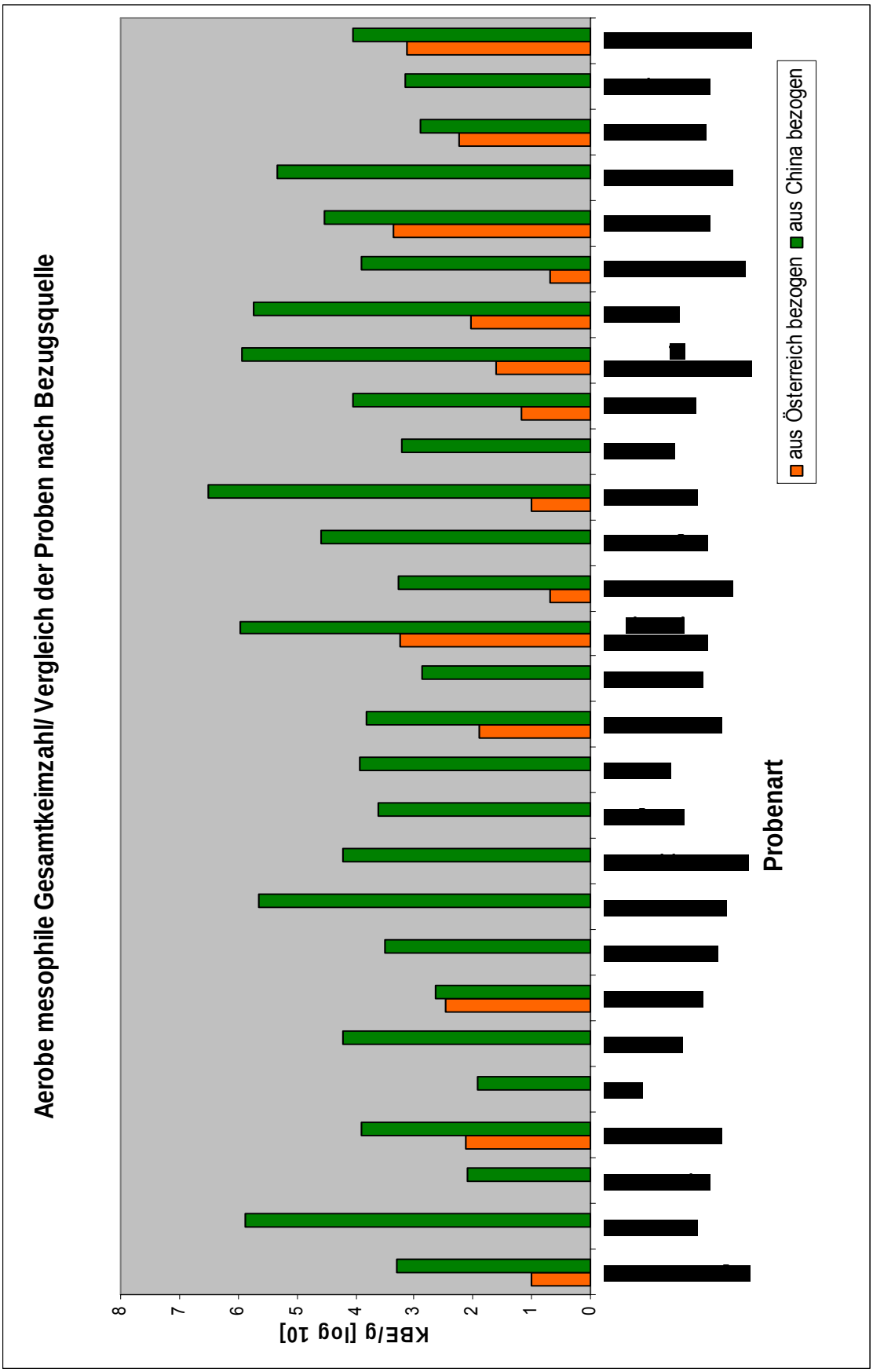

Abbildung 76: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl der Proben vergleichend nach der Bezugsquelle

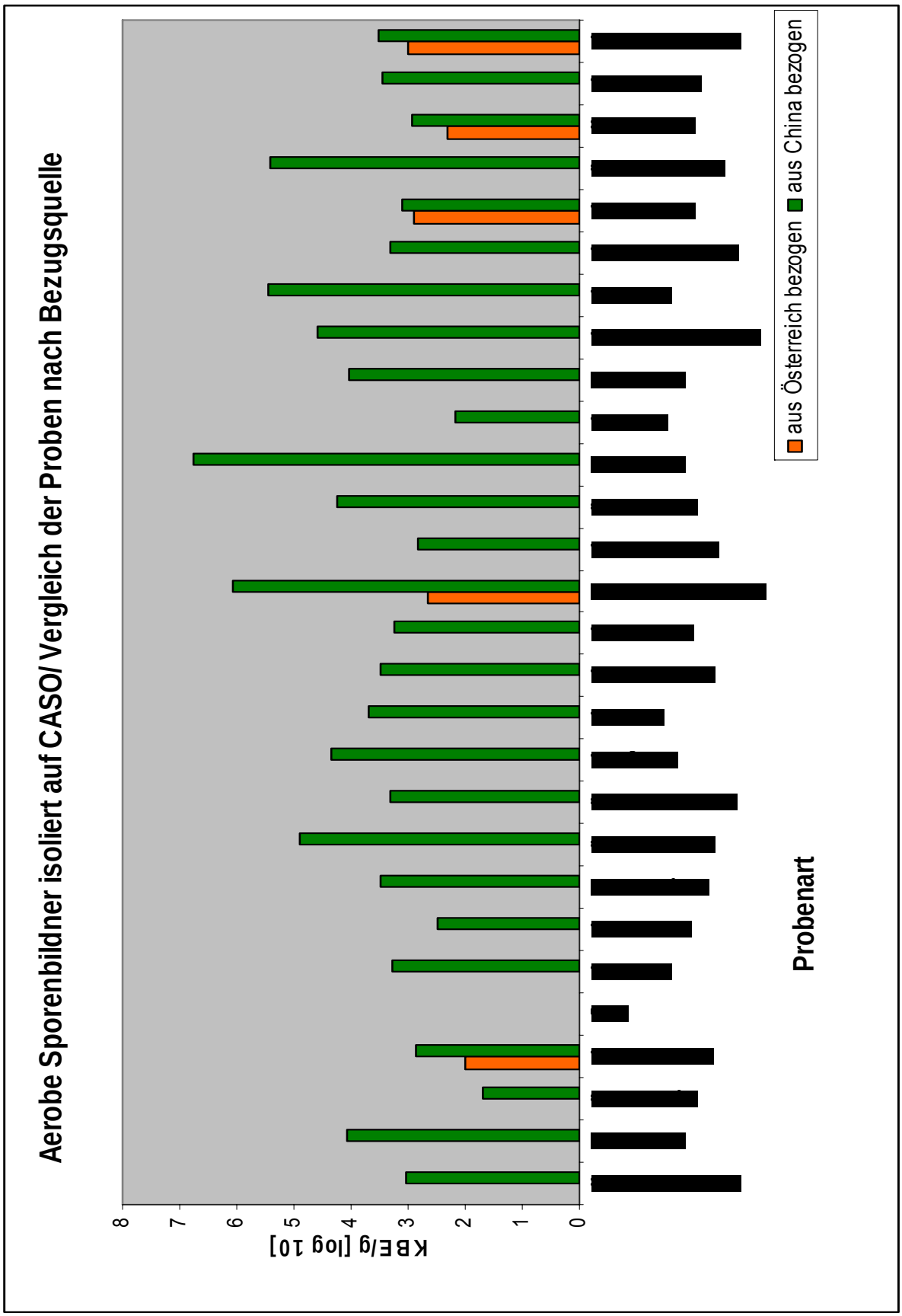

Abbildung 77: Keimzahl der aeroben Sporenbildner in den Proben vergleichend nach der Bezugsquelle (isoliert auf CASO-Agar)

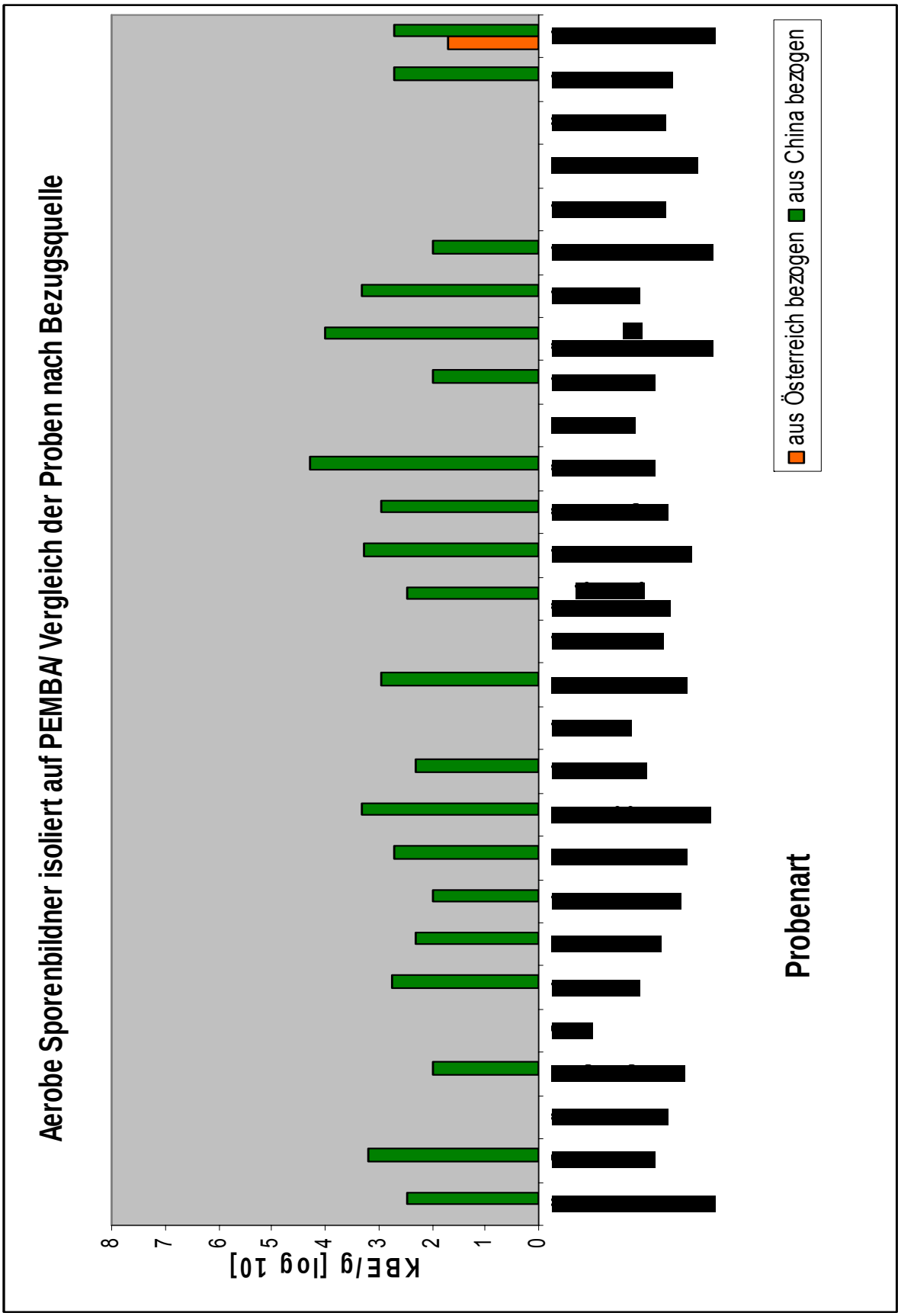

Abbildung 78: Keimzahl der aeroben Sporenbildner in den Proben vergleichend nach der Bezugsquelle (isoliert auf PEMBA-Agar)

3.2. Molekularbiologische Ergebnisse

Die auf PEMBA-Agar kultivierten verdächtigen *Bacillus*-Kolonien wurden auf CASO-Agar isoliert. Pro Probennummer wurden 2 Isolate überimpft. Nach mikroskopischer Kontrolle mittels Methylenblau-Färbung erfolgte die DNA-Aufbereitung, PCR-Ansatz und Auftragen auf Agarosegel wie im Kapitel 1.4.2. „Grundlagen zu den molekularbiologischen Parametern“ beschrieben.

3.2.1. Molekularbiologische Ergebnisse der aus China bezogenen Proben

Im Folgenden werden die molekularbiologischen Ergebnisse der einzelnen Arzneipflanzen, die direkt aus China importiert wurden, angeführt.

3.2.1.1. Detektion von *Bacillus cereus*-DNA (nach PARK, 2007)

Von den untersuchten China-Proben waren die Isolate CH 3/1, 3/2, 9/1, 12/1, 14/1, 14/2, 29/2, 36/1, 37/1, 37/2, 41/1, 26/2, 50/1 und 55/ 2 negativ.
Bei den anderen Isolaten konnte *Bacillus cereus*-DNA nachgewiesen werden (Amplifikat-Größe: 475 bp).

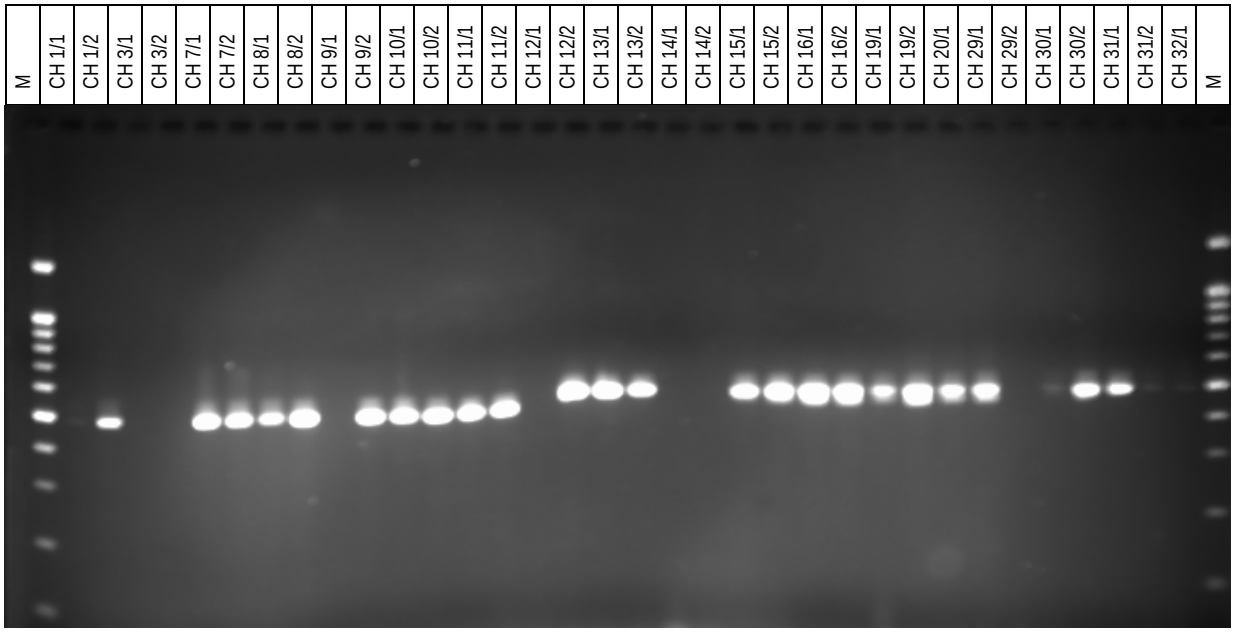

Abbildung 79: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach PARK)

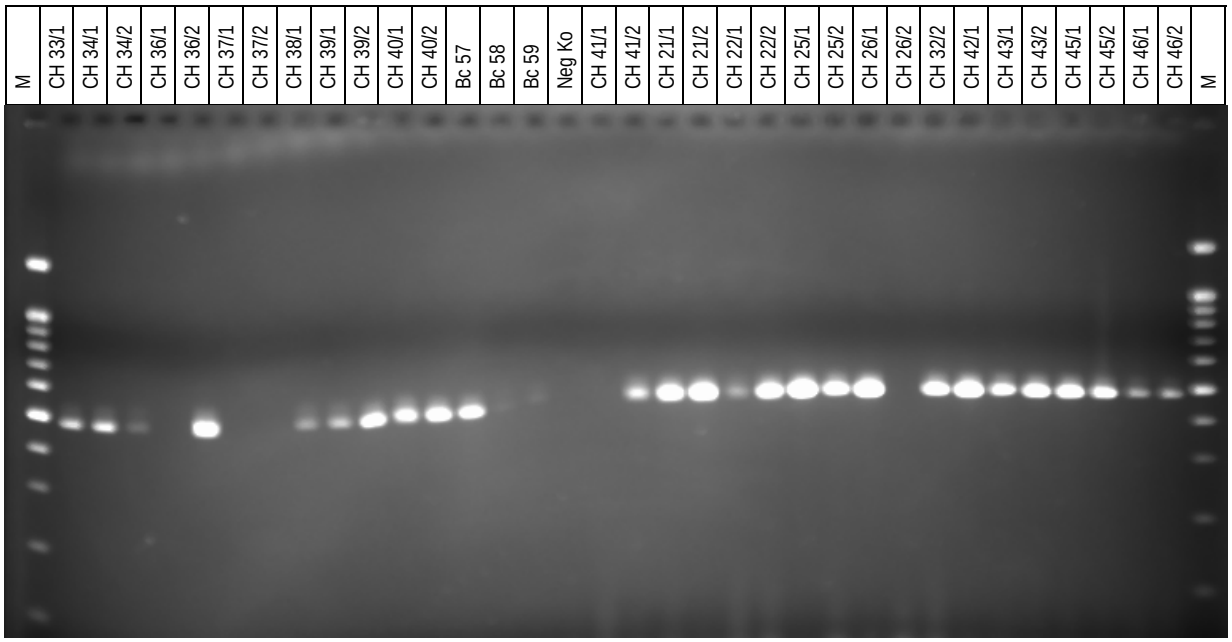

Abbildung 80: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach PARK)

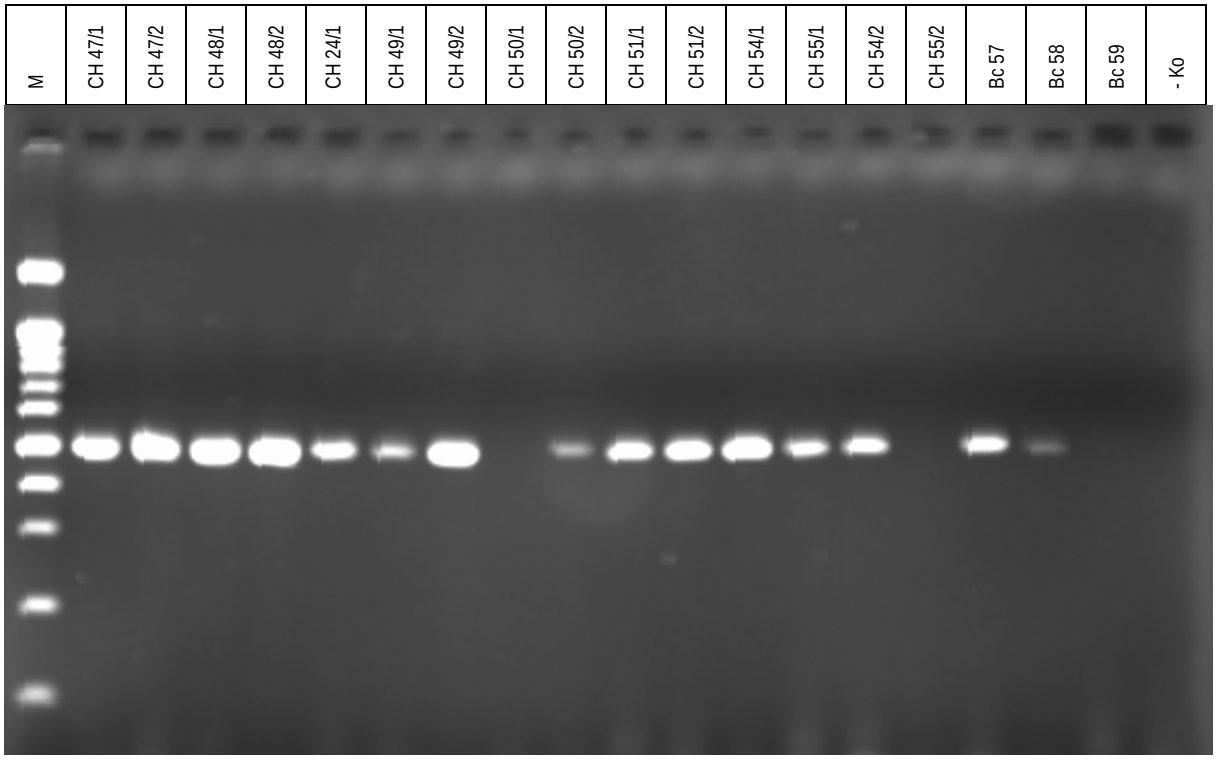

Abbildung 81: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach PARK)

3.2.1.2. Detektion von DNA der *Bacillus cereus* Gruppe (nach PARK, 2007)

Von den untersuchten China-Proben war das Isolat CH 55/2 negativ.

Bei allen anderen Isolaten konnte *Bacillus cereus* Gruppe-DNA nachgewiesen werden (Amplifikat-Größe: 400 bp).

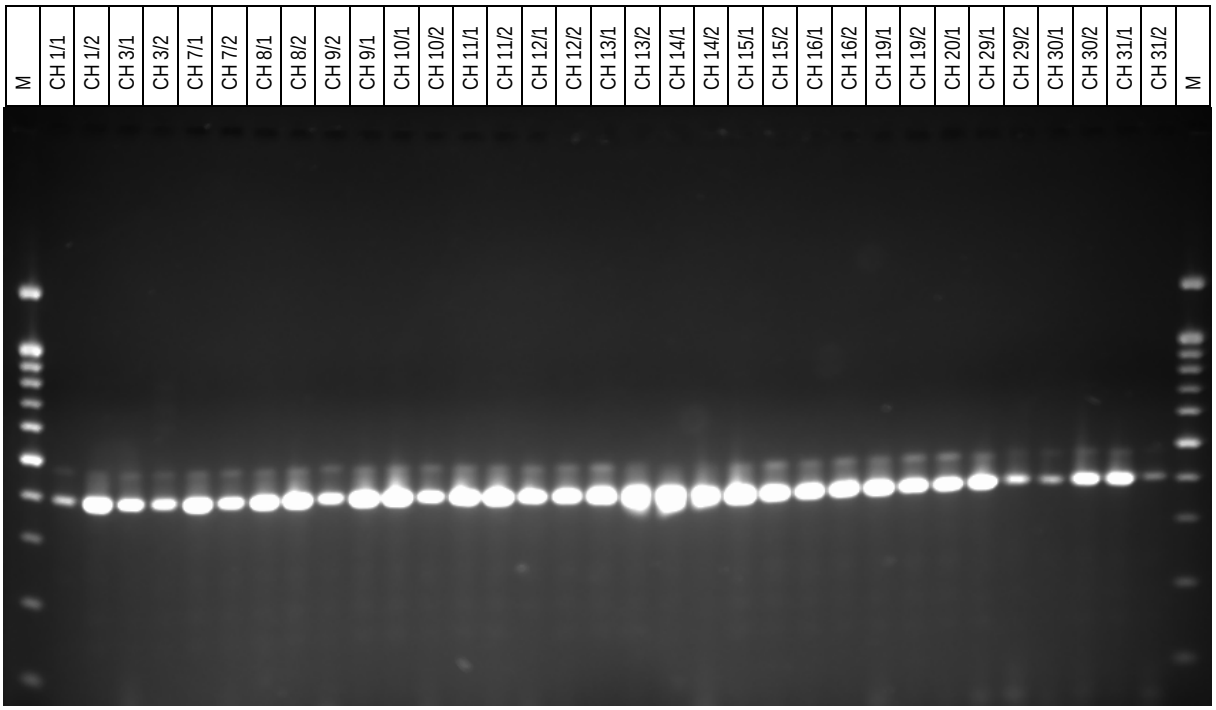

Abbildung 82: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach PARK)

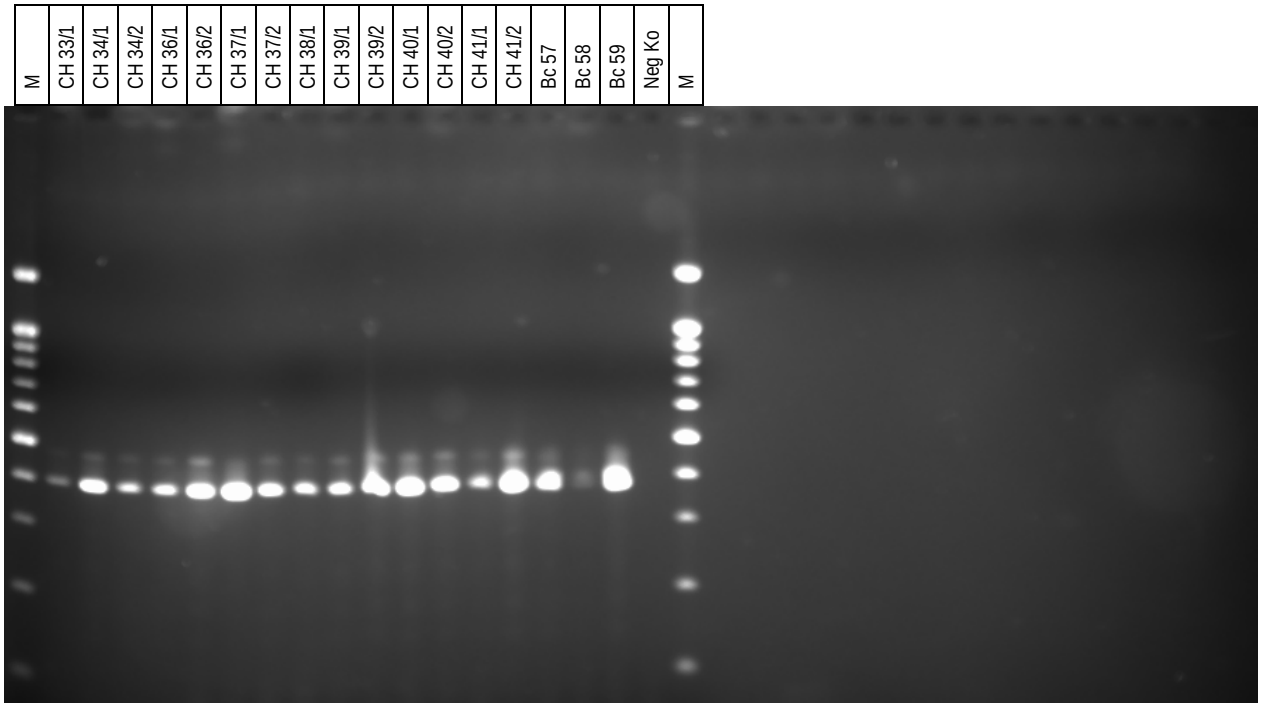

Abbildung 83: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach PARK)

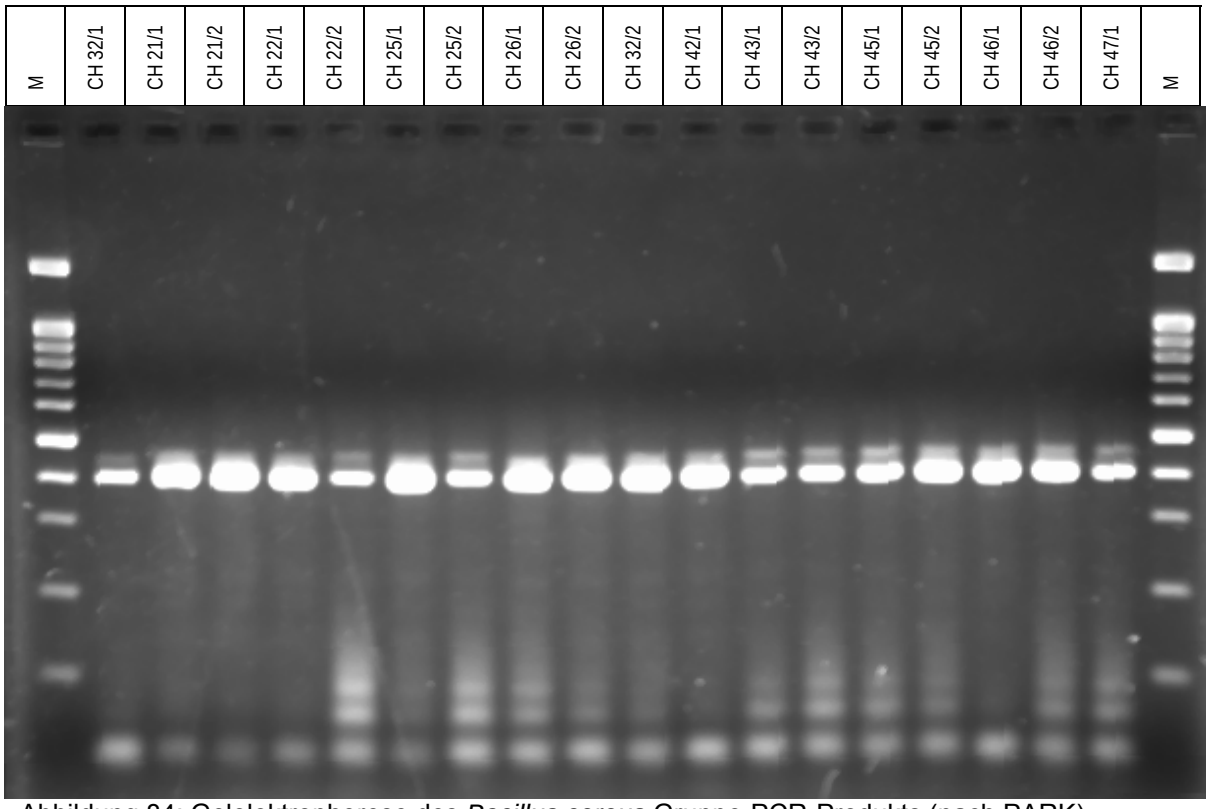

Abbildung 84: Gelelektropherese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach PARK)

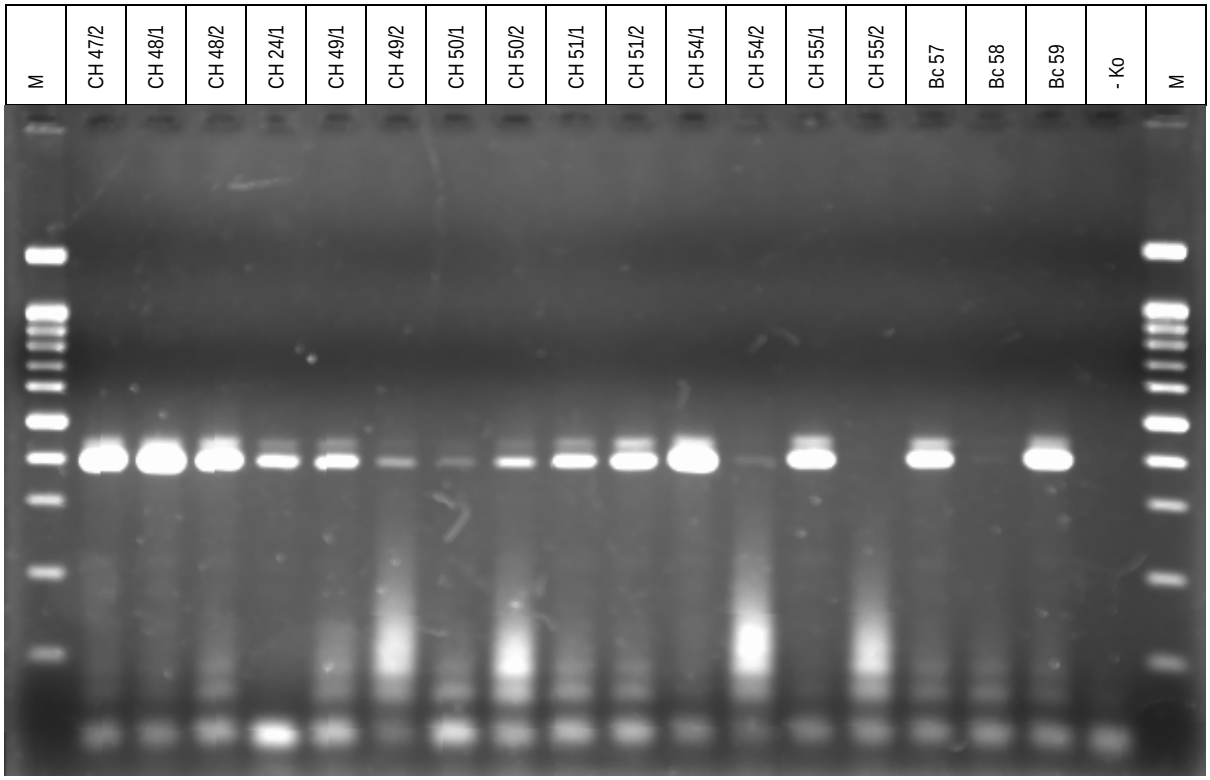

Abbildung 85: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach PARK)

3.2.1.3. Detektion von DNA der *Bacillus cereus* Gruppe (nach CHANG, 2003)

Von den untersuchten China-Proben waren die Isolate CH 30/1, 33/ 1, 49/1, 50/1 und 55/2 negativ.

In allen anderen Isolaten konnte *Bacillus cereus* Gruppe-DNA nachgewiesen werden (Amplifikat- Größe: 533 bp).

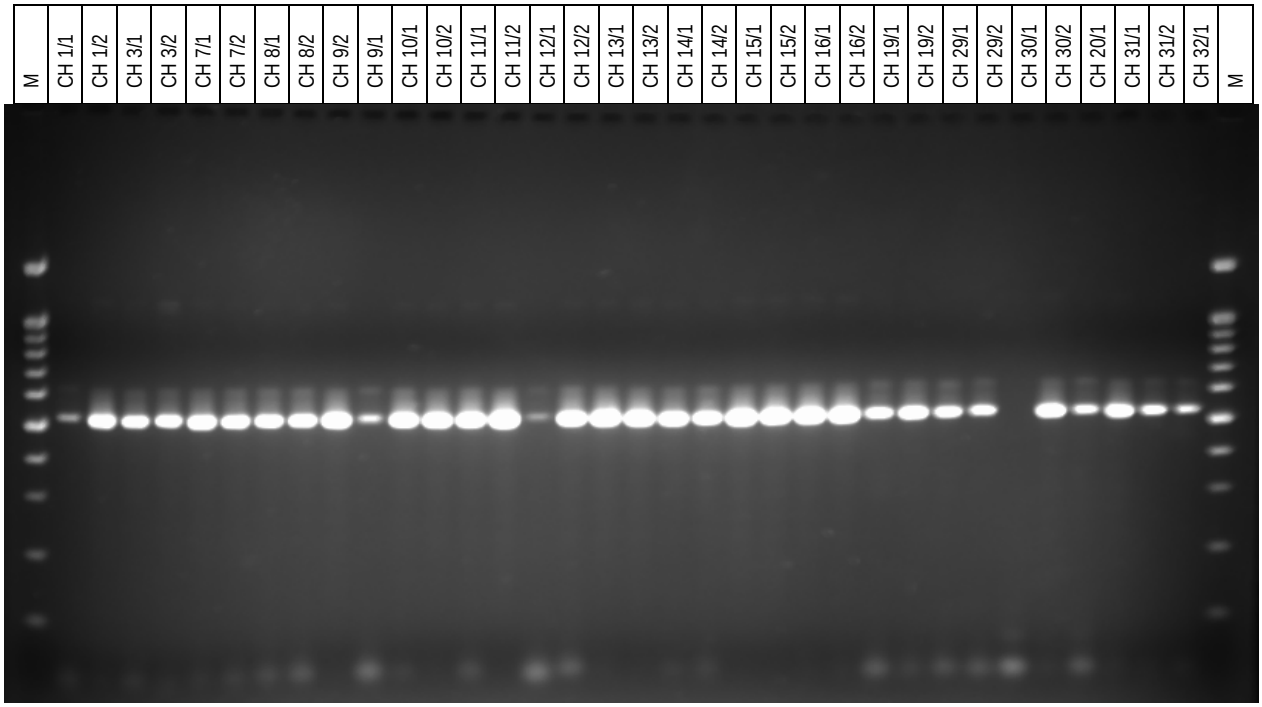

Abbildung 86: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach CHANG)

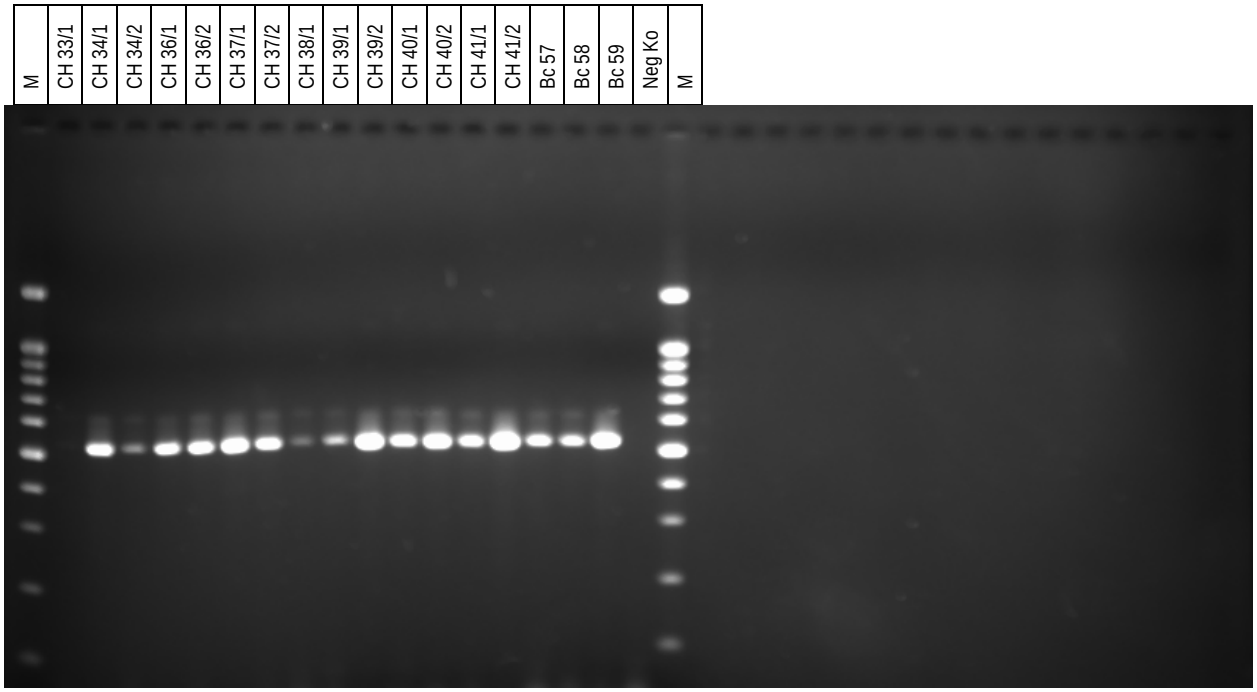

Abbildung 87: Gelelektropherese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach CHANG)

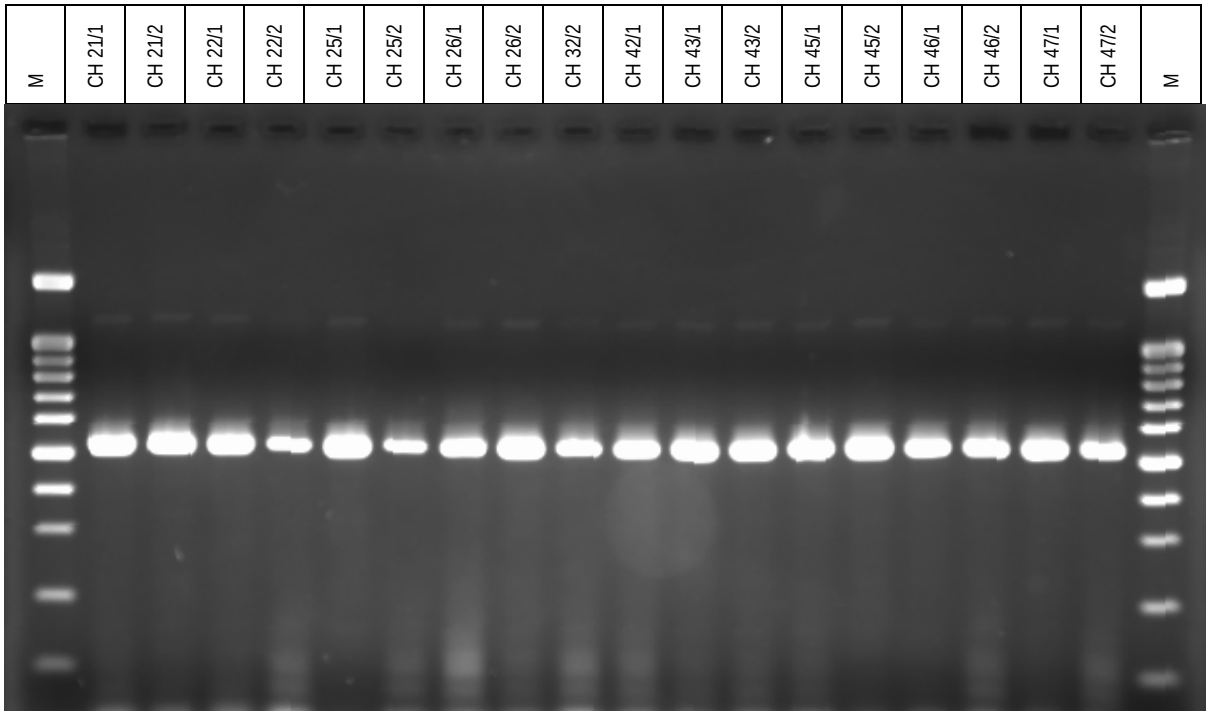

Abbildung 88: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach CHANG)

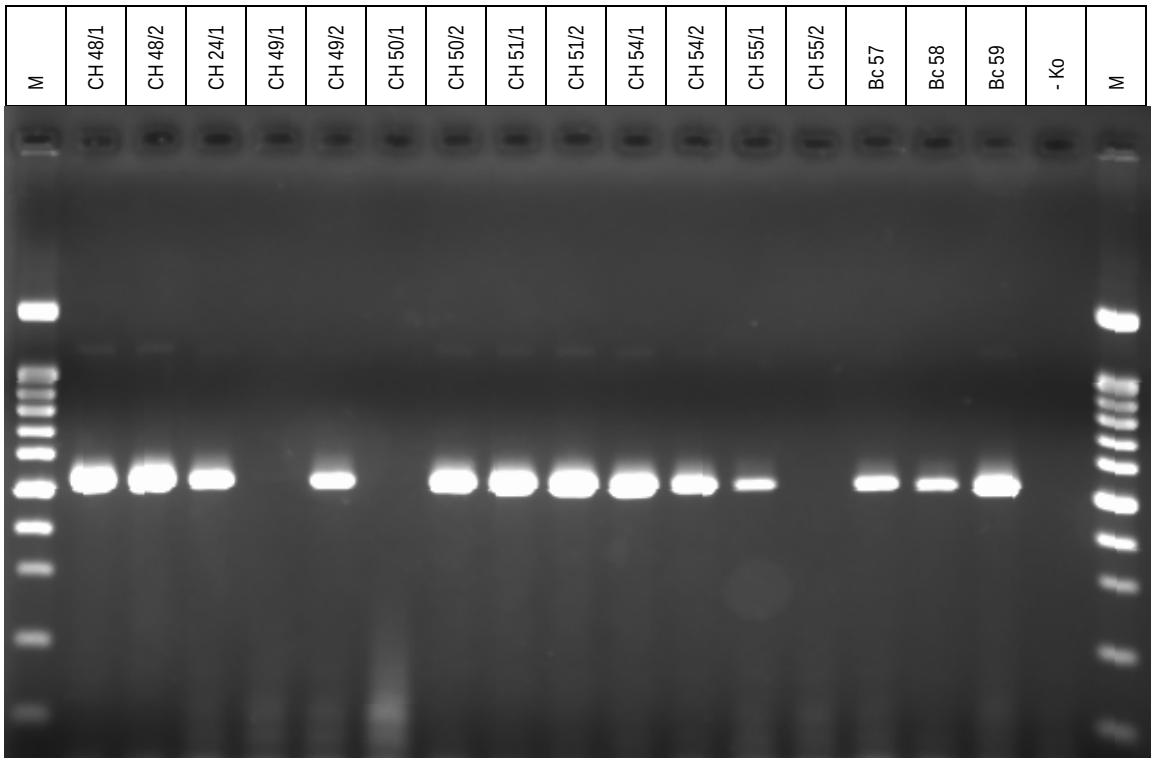

Abbildung 89: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach CHANG)

3.2.1.4. Detektion von *Bacillus cereus*-DNA (nach YAMADA, 1999)

Von den untersuchten China-Proben waren die Isolate CH 1/2, 3/1, 3/2, 9/1, 12/1, 14/1, 14/2, 29/2, 31/1, 34/2, 39/1, 41/2 und 55/2 negativ.
In allen anderen Isolaten konnte *Bacillus cereus*-DNA nachgewiesen werden (Amplifikat-Größe: 365 bp).

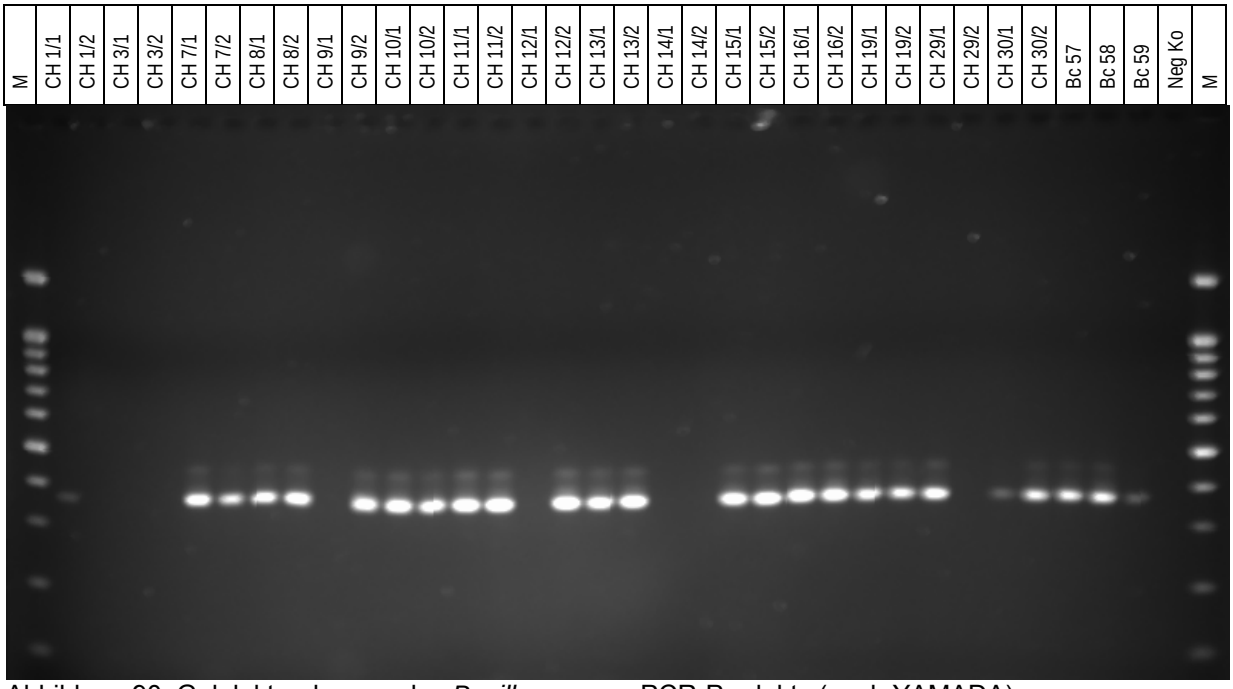

Abbildung 90: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach YAMADA)

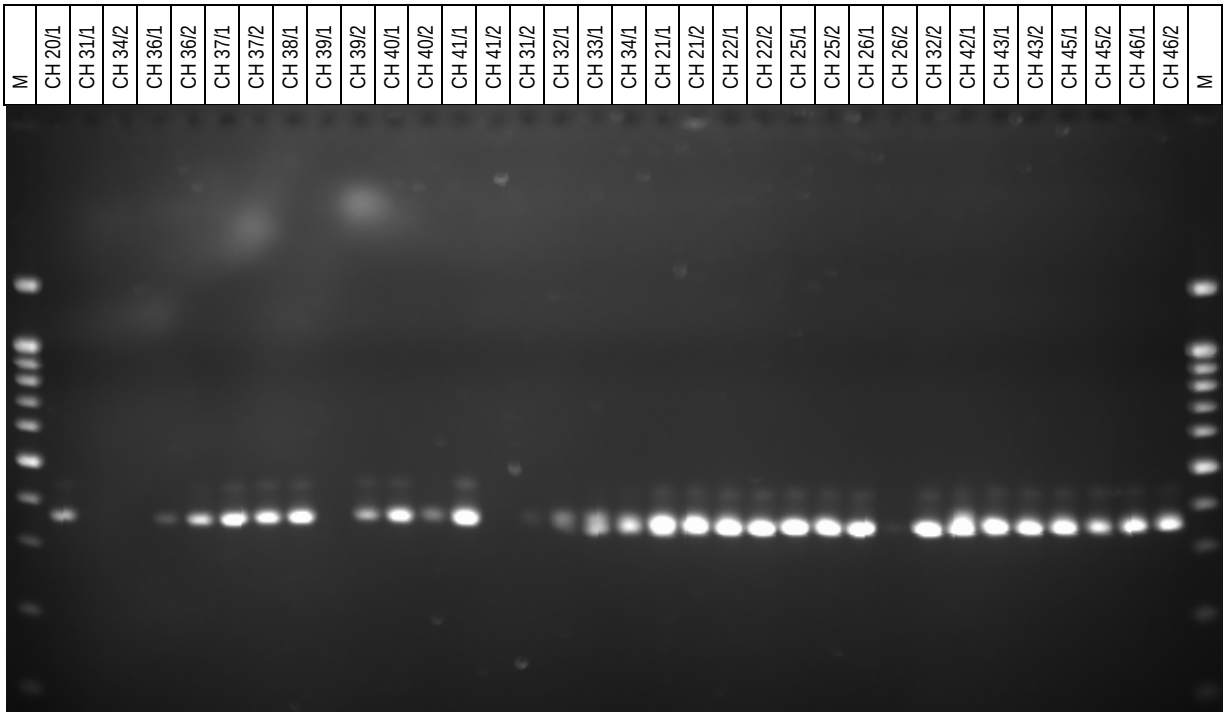

Abbildung 91: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach YAMADA)

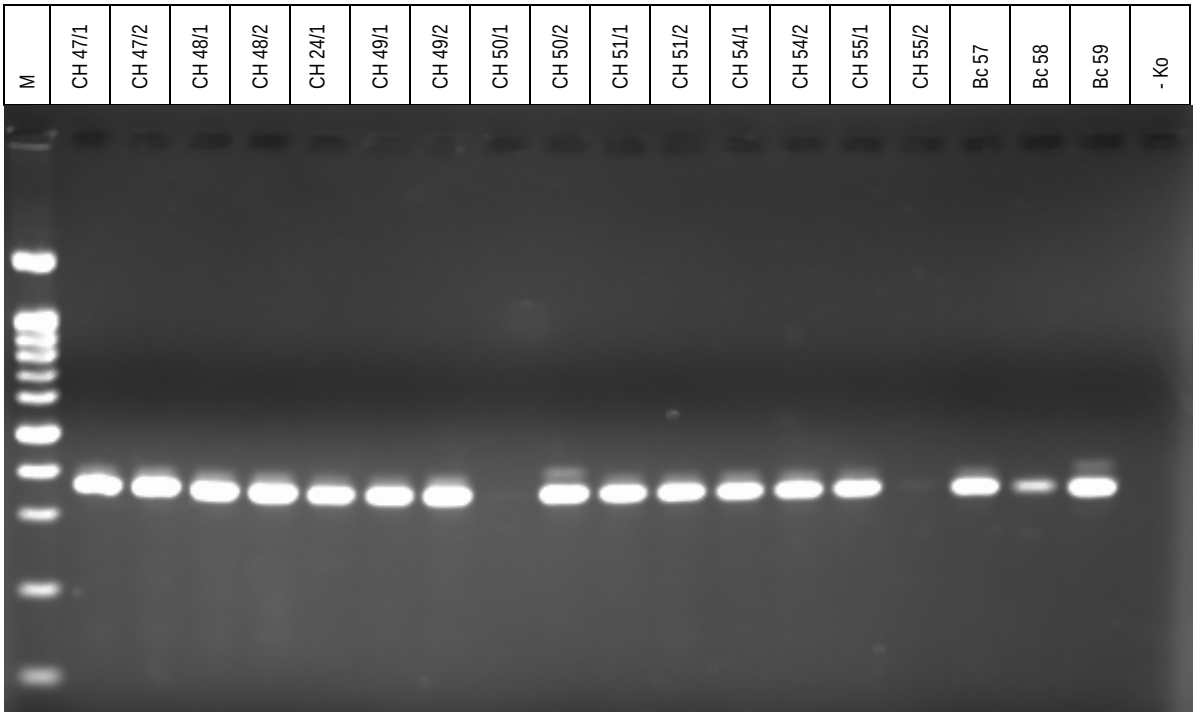

Abbildung 92: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach YAMADA)

3.2.2. Molekularbiologische Ergebnisse der in Österreich bezogenen Proben

Im Folgenden werden die molekularbiologischen Ergebnisse der Arzneipflanzen, die in Österreich bezogen wurden, dargestellt.
Von den untersuchten AT-Proben konnte nur eine verdächtige Kolonie auf PEMBA-Agar (aus Probe AT 29) isoliert werden.

3.2.2.1. Detektion von DNA der *Bacillus cereus* Gruppe und von *Bacillus cereus*

In der Probe AT 29 konnte weder DNA von *Bacillus cereus*, noch der *Bacillus cereus* Gruppe mittels PCR nachgewiesen werden.

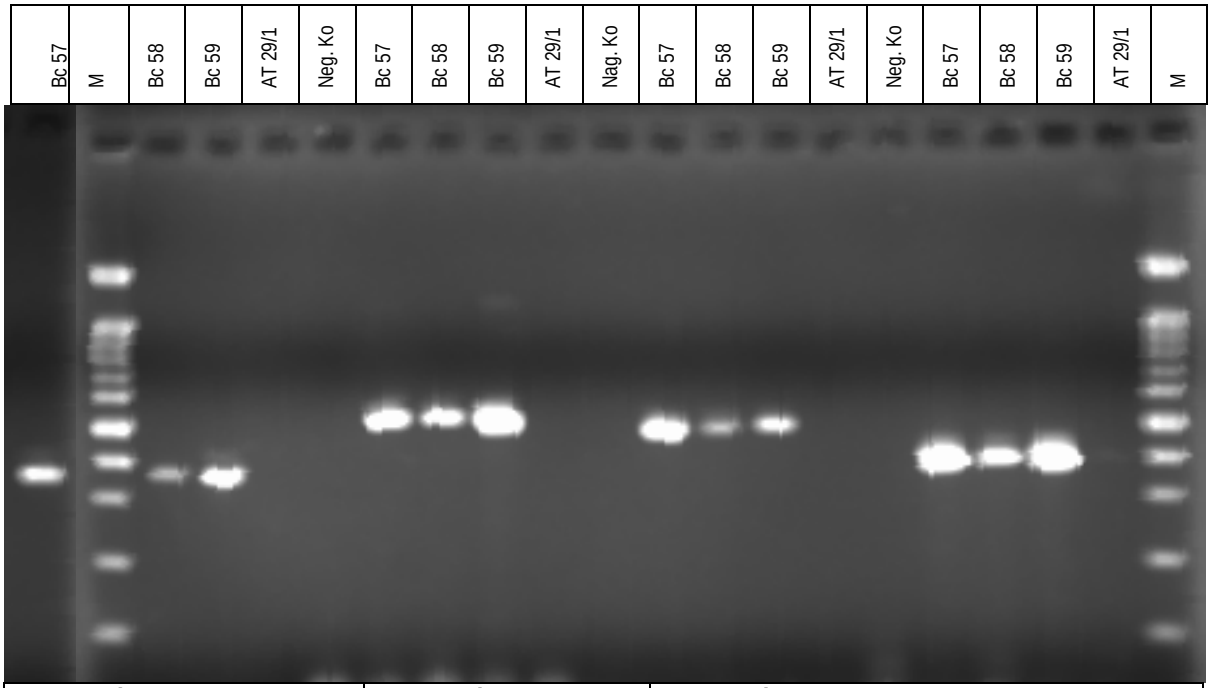

Abbildung 93: Gelelektrophorese der *Bacillus cereus*- und *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkte

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es den mikrobiellen Status von pflanzlichen Arzneimitteln zu erfassen. Es fließen sehr viele Faktoren mit ein, die die Resultate beeinflussen. Eine große Rolle spielt wie schon erwähnt die natürliche Mikroflora der Pflanzen (siehe Kapitel 1.3.), die sich in hohen Gesamtkeimzahlen widerspiegelt. Es ist auch zu berücksichtigen, dass die Verteilung von Mikroorganismen und damit eventuell vorhandenen pathogenen Keimen in einer trockenen Matrix sehr inhomogen ist (IHRIG et. al., 2004; HARTWIG et. al., 2006). Bei Kontaminationen, die während des Trocknungsvorganges eventuell unter freiem Himmel, wie es bei chinesischen Kräutern durchaus der Fall ist (HOU et. al., 2005), hervorgerufen werden, kommt es zu einer sogenannten Nesterbildung oder Spot-Kontamination. Diese Kontaminationen sind dann meist nicht gleichmäßig verteilt, sondern nur punktuell und sehr begrenzt in der jeweiligen Charge festzustellen (IHRIG et. al. 2004; HARTWIG et. al., 2006; KABELITZ, 2007). Somit stellt auch die Probennahme einen wichtigen Faktor bei der Ermittlung des Hygienestatus von Kräutern dar. Wird lediglich eine Einmalprobe eines pflanzlichen Arzneimittels untersucht und darin keine Pathogenen gefunden, liefert diese Vorgehensweise kein eindeutiges negatives Ergebnis (HARTWIG et. al., 2006; KABELITZ, 2007).
Aus diesem Grund gibt es folgende Empfehlung, pro Charge eines pflanzlichen Arzneimittels 5 Proben zu ziehen, die einzeln auf Vorhandensein von pathogenen Keimen zu untersuchen sind (EHIA, 2008). Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Probenmaterial handelt es sich um Stichproben, die einmalig aus einer vorliegenden Menge an Arzneimitteln entnommen und untersucht wurden. Eine 5-malige Probenziehung aus einer Charge, welche empfehlenswert wäre, war für diese Arbeit nicht durchführbar.

Weiters ist zu berücksichtigen, dass manche Pflanzen inhärente Stoffe und ätherische Öle beinhalten, die antibakterielle und mikrobiozide Wirkungen entfalten

können (BECKMANN et. al., 1996). Auch dadurch kann es zu einer Verfälschung des mikrobiologischen Untersuchungsergebnisses kommen (DEBOER et. al., 1985). Es wird deshalb empfohlen, die Vorgehensweise während des Testansatzes zu überdenken und darauf zu achten, dass Vorverdünnungen, die für die mikrobielle Untersuchung verwendet werden, nicht länger als 30 min stehen (BECKMANN et. al., 1996). Dieses Zeitlimit wurde in dieser Arbeit korrekt eingehalten, um die Auswirkungen der eventuell in den Pflanzenproben vorhandenen antibakteriellen Hemmstoffe soweit wie möglich zu minimieren.

Es sei auch erwähnt, dass die Anwendung der TCM-Kräuter hauptsächlich als Dekokt- oder Teezubereitung erfolgt (siehe Kapitel 1.2.). Durch das damit verbundene Überbrühen der Arzneimittel mit kochendem Wasser verringert sich wie verschiedenen Studien aufzeigen die Gesamtkeimzahl um mindestens eine Zehnerpotenz. Manche Keime wie Enterobakterien werden sogar vollständig abgetötet (HÄRTLING, 1983; LEIMBECK, 1987) beziehungsweise sind in der niedrigsten Verdünnungsstufe nicht mehr nachweisbar (KNEIFEL et. al., 2001). Unter der Voraussetzung, dass die korrekten Zubereitungshinweise eingehalten werden, sind die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse für den Konsumenten von pflanzlichen Arzneimitteln letztendlich zu relativieren.

Eine mikrobielle Belastung der pflanzlichen Arzneiproben konnte in 100% der aus China bezogenen Proben und in 51,7% der aus Österreich bezogenen Proben nachgewiesen werden, wobei die Werte der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl zwar an der oberen Grenze jedoch in keiner der untersuchten Probe über den vorgegeben Richt-und Warnwerten (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9) lagen.
Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl erreichte Maximalwerte von 9,5 x 10^6 KBE/g in der Probe CH1 (*Prunella spica*) der aus China bezogenen Proben und 2,2 x 10^3 KBE/g in der Probe AT25 (*Rehmanniae radix*) der aus Österreich bezogenen Proben. Wie verschiedene Studien belegen (ANDREWS et. al., 1980; ALONZO et. al., 1994; BECKMANN et. al., 1996; FETT, 2000; KNEIFEL et. al., 2002; MERCIER et. al., 2000; MORRIS et. al., 1997) beherbergen Pflanzen ein großes Spektrum an „natürlichen“ Mikroorganismen. Das Vorhandensein dieser natürlichen Mikrobiota der Pflanzen beeinflusst die nachweisbaren Niveaus der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl.

Kein Nachweis von Mikroorganismen in den Pflanzenproben bei einer Verdünnung von 10^1, wie dies bei 48,3% der aus Österreich bezogenen Proben der Fall war, läßt die Frage nach Bestrahlung der Arzneipflanzen aufwerfen. Nach österreichischer Rechtslage dürfen Kräuter und Gewürze entsprechend einer Zulassung entweder durch Verordnung (Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz 2006, 2. Abschnitt, § 9: Behandlung mit ionisierenden Strahlen) oder durch Bescheid (§ 14 Absatz 3 Lebensmittelgesetz 1975) nach vorgegebenen Rahmen-und Durchführungsrichtlinien bestrahlt werden.

Hohe Werte bei der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl geben einen Hinweis auf einen niedrigen sanitären Umweltstatus und einen niedrigen Standard betreffend Herstellung und Präparation der Kräuter (BECKMANN et. al., 1996). Solche Gesamtkeimzahlen müssen aber keine Korrelation zum Vorhandensein von pathogenen Mikroorganismen haben (LIMYATI et. al., 1998).
Diese Aussage konnte zumindest durch die Untersuchungsergebnisse der aus Österreich bezogenen Proben in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Tabelle 12). Die Untersuchungen der aus Österreich bezogenen Proben zeigten Gesamtkeimzahlen von bis zu 10^3 KBE/g. Dieser Keimzahlbereich wurde auch bei der Untersuchung auf aerobe Sporenbildner nicht überschritten. Weitere Untersuchungen auf Selektivnährböden ergaben in einer Probe (AT16 *Citri reticulatae pericarpium*) einen Nachweis von Schimmelpilzen von 1,5 x 10^1 KBE/g, alle weiteren untersuchten mikrobiellen Parameter (Enterokokken, Enterobakterien, koagulase-positive Staphylokokken, Laktobazillen und Clostridien) konnten in keiner AT-Probe nachgewiesen werden.
Die nachgewiesenen Werte der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen der aus China bezogenen Arzneipflanzen lagen in einem Bereich zwischen 10^1 –10^7 KBE/g (siehe Tabelle 11). In diesem Bereich lagen auch die nachgewiesenen aeroben Sporenbildner. Bei weiteren untersuchten mikrobiellen Parametern wurden wesentlich niedrigere Keimzahlbereiche detektiert. Die maximale Keimzahl bei Schimmelpilzen war 10^5 KBE/g, beim Nachweis von Enterokokken, Enterobakterien und Laktobazillen wurden Maximalwerte von 10^4 KBE/g erreicht, beim Nachweis von Koagulase-positive Staphylokokken und Clostridien lag der Maximalwert der Keimzahl bei 10^2 KBE/g.

Tabelle 11: Keimzahlbereiche der einzelnen Parameter in den untersuchten Proben bezogen aus China

Parameter	**Anzahl der positiven CH-Proben (%)**	**Keimzahlbereich (KBE/g)**
Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl	100	$8,5 \times 10^1$ - $9,5 \times 10^6$
Enterobakterien	21,8	$3 \times 10^1 – 4 \times 10^4$
Hefe/ Schimmelpilze	67,3	$5 \times 10^0 – 3,4 \times 10^5$
Aerobe Sporenbildner	96,4	$5 \times 10^1 – 2 \times 10^7$
Enterokokken	12,7	$1 \times 10^2 – 1,9 \times 10^4$
Laktobazillen	32,7	$5 \times 10^1 – 1 \times 10^4$
Koagulase-positive Staphylokokken	1,8	1×10^2
Anaerobe Sporenbildner	30,9	$5 \times 10^0 – 1 \times 10^2$

Tabelle 12: Keimzahlbereiche der einzelnen Parameter in den untersuchten Proben bezogen aus Österreich

Parameter	**Anzahl der positiven AT-Proben (%)**	**Keimzahlbereich (KBE/g)**
Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl	51,7	$5 \times 10^0 – 2,2 \times 10^3$
Enterobakterien	0	-
Hefe/ Schimmelpilze	3,5	$1,5 \times 10^1$
Aerobe Sporenbildner	17,2	$1 \times 10^2 – 1 \times 10^3$
Enterokokken	0	-
Laktobazillen	0	-
Koagulase-positive Staphylokokken	0	-
Anaerobe Sporenbildner	0	-

Die Untersuchung auf Hefen und Schimmelpilze gibt Aufschluss auf die Lagerungs- und Trocknungsqualität der Arzneipflanzen (AZIZ et. al., 1998; IHRIG et. al., 2004). In 67,3% der aus China bezogenen und in 3,5% der aus Österreich bezogenen Proben wurden Schimmelpilze und deren Sporen nachgewiesen. Mit Maximalwerten von 10^5 KBE/g (siehe Tabelle 11) in den CH-Proben CH1 (*Prunella spica*), CH2 (*Mori folium*) und CH25 (*Leonuri herba*) waren die aus China bezogenen Proben in einem deutlich höheren Maße mit Schimmelpilzen belastet als die aus Österreich bezogenen Proben (siehe Tabelle 12). Es lag jedoch keine der insgesamt 84 überprüften Arzneipflanzen-Proben über den vorgegebenen Richt- beziehungsweise Warnwerten für Hefen und Schimmelpilze der Europäischen Pharmakopoe, Kategorie 4A (siehe Tabelle 8). Auch die empfohlenen Grenzwerte der EHIA bezüglich Vorhandensein von Hefen und Schimmelpilzen in Materialien zur Herstellung von teeähnlichen Produkten (siehe Tabelle 10) wurden in keiner der untersuchten Proben überschritten.
Die Anwesenheit von Schimmelpilzen ist insofern bedenklich, da viele Vertreter die Fähigkeit zur Bildung von Pilzexotoxinen (Mykotoxine) haben (BAXTER et. al., 1984; HALT, 1998). Das Vorhandensein von Mykotoxinen wurde in dieser Arbeit nicht näher geprüft. AZIZ et. al. (1998) beschreibt jedoch in seiner Studie über Kontaminationen von Schimmelpilzen in handelsüblichen medizinisch verwendeten Pflanzen, dass in 84 untersuchten Proben bezogen aus Indien 20 verschiedene Schimmelpilz-Arten nachgewiesen werden konnten, von denen etwa ein Drittel Aflatoxine produzierten. Der Nachweis von Schimmelpilzen sollte somit mit Vorsicht beurteilt werden, da die eventuell vorhandenen Mykotoxine hochtoxisch sind und Schädigungen im Konsument hervorrufen können (AZIZ et. al., 1998; MADIGAN et. al., 2001; IHRIG et. al., 2004).

Wie schon im 1. Kapitel dieser Arbeit angeführt, steht der Nachweis von Enterobakterien in einem direkten Zusammenhang mit der natürlichen Mikroflora der Arzneipflanzen, weshalb dieser mikrobiologische Untersuchungsparameter für eine Aussage zum Hygienestatus von Pflanzenproben deutlich in Frage gestellt werden sollte (THIEDE und BECKMANN, 2004 a und b; BECKMANN et. al., 1996; KNEIFEL et. al., 2002). Bemerkenswert ist, dass außer in der Europäischen Pharmakopoe in keinem anderen Arzneimittelbuch die Untersuchung auf „Enterobakterien“ für den mikrobiologischen Qualitätsstatus pharmazeutischer Mittel aus der Phytotherapie

gefordert ist, dass aber eine Differenzierung in apathogene und obligat oder fakultativ humanpathogene Enterobakterien nicht vorgeschrieben ist (HABERER, 1999).
In 21,8% der aus China bezogenen Arzneipflanzen konnten Enterobakterien nachgewiesen werden, wobei lediglich in 5 der 12 positiven Proben die Keimzahlen etwas über 10^4 KBE/g lagen. Bei den aus Österreich bezogenen Arzneipflanzen konnte in keiner Probe Enterobakterien nachgewiesen werden. Im Vergleich mit anderen Studien, die sich mit Enterobakterien auf Arzneipflanzen beschäftigten (THIEDE et. al., 2002 und 2004; BECKMANN et. al., 1996 und 2003; BAXTER et. al., 1982; LIMYATI et. al., 1998) sind die in dieser Arbeit nachgewiesenen Werte als eher gering zu bewerten, wobei eine durchaus aussagekräftigere Untersuchung auf Differenzierung in *Escherichia coli* oder Salmonellen aufgrund der geringen Enterobakterien-Keimzahlen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Das Vorhandensein von Koagulase-positiven Staphylokokken in den Arzneipflanzen wurde untersucht, da die Anwesenheit auf eine Kontamination von Umwelt und Umgebung, aber auch auf einen niedrigen Hygienestandard während der Bearbeitung der pflanzlichen Produkte hinweist. Koagulase-positive Staphylokokken haben auch die Fähigkeit Entertoxine zu bilden, die sich in Form von akuter Gastroenteritis schädigend auf den Konsument auswirken können (LIMYATI et. al., 1998).
In den 84 untersuchten Proben konnte nur in einer Probe (CH26 *Menthae herba*) Koagulase-positive Staphylokokken mit der Keimzahl 10^2 nachgewiesen werden.

Clostridien waren quantitativ nur in 17 Proben der aus China bezogenen Arzneipflanzen nachweisbar mit einem Keimzahlbereich zwischen 5×10^0 –1×10^1 KBE/g. Verglichen mit den Angaben aus der Literatur (BECKMANN et. al., 1996; EISGRUBER und REUTER, 1987), in denen Keimzahlwerte für anaerobe Sporenbildner unter 10^3 KBE/g angegeben werden, liegen die Werte aus dieser Arbeit im unteren Bereich. Laut der Studie von EISGRUBER und REUTER (1987) über anaerobe Sporenbildner in handelsüblichen Gewürzen stellen solch geringe Clostridien-Keimzahlen, obwohl sie durchaus Lebensmittelvergiftungen auslösen können, kein Risiko für den Konsumenten dar.

Aerobe Sporenbildner wurden in 96,4% der aus China bezogenen Arzneipflanzen und in 17,2% der aus Österreich bezogenen Proben detektiert und stellen somit den am häufigsten nachgewiesenen mikrobiellen Parameter dar (siehe Tabelle 11 und 12). Die höchsten Keimwerte bis 10^7 KBE/g konnten in den aus China bezogenen Pflanzendrogen nachgewiesen werden. Die Maximalwerte wurden in den Proben CH1 (*Prunellae spica*), CH2 (*Mori folium*), CH8 (*Citri reticulatae pericarpium*), CH16 (Carthami flos) und CH43 (*Glycyrrhizae radix praeparata cum melle*) erreicht.
Eine vergleichbar hohe Nachweisrate von aeroben Sporenbildnern in medizinisch verwendeten Pflanzen ist in der Studie von MARTINS et. al. (2001) nachzulesen. In dieser Studie über die Evaluierung von mikrobieller Qualität in Arzneipflanzen konnten in 96,8% der untersuchten Pflanzenproben aerobe Sporenbildner nachgewiesen werden, wobei in 19,2% der positiven Proben die Nachweisgrenze über 10^3 Sporen/g lag.

Aufgrund des ausgeprägten vermehrten Vorhandenseins von aeroben Sporenbildnern in den in dieser Arbeit untersuchten Arzneipflanzen, erfolgte eine molekularbiologische Detektierung von *Bacillus cereus*- und *Bacillus cereus* Gruppe-DNA aus den kultivierten Kolonien in Anlehnung an die Studien von CHANG et. al. (2003), PARK et. al. (2007) und YAMADA et. al (1999).
Für die Detektion von *Bacillus cereus* auf Speziesebene wurde als diagnostischer Marker das *gyrB* Gen herangezogen, der Nachweis der Arten der *Bacillus cereus* Gruppe erfolgte über das *groEL* Gen.

Die Ergebnisse zeigen, dass von den aus Österreich bezogenen Proben mit positiver Kultur auf aerobe Sporenbildner (in 17,2%) kein einziger Nachweis von *Bacillus cereus*- und *Bacillus cereus* Gruppe-DNA möglich war (Abbildung 93). Demnach handelt es sich bei den kultivierten Keimen nicht um *Bacillus cereus* oder Vertretern der *Bacillus cereus* Gruppe, sondern um andere Arten der Gattung *Bacillus.*
Von den aus China bezogenen Proben wurden 42 verschiedene Arzneipflanzen mittels PCR untersucht, wobei pro Probe maximal 2 Isolate detektiert wurden (insgesamt 79 Isolate).
In 93,7% aller Isolate konnte mittels der PCR-Methode sowohl nach PARK et. al. (2007) als auch nach CHANG et. al. (2003) eindeutig die *Bacillus cereus* Gruppe nachgewiesen werden. Bei 4 Isolaten konnte mit der Methode nach CHANG et. al.

(2003) keine spezifische *groEL* Gensequenz amplifiziert werden, mit der Methode nach PARK et. al. (2007) waren diese 4 Isolate jedoch eindeutig positiv. In einem Isolat (CH55/ Isolat 2) konnte mit keiner der beiden Methoden die *Bacillus cereus* Gruppe bestätigt werden.

In 46,6% der Isolate konnte eindeutig *Bacillus cereus*-DNA amplifiziert werden, das heißt in 36 aus China bezogenen Proben wurde *Bacillus cereus* mittels der PCR-Methode sowohl nach PARK et. al. (2007) als auch nach YAMADA et. al. (1999) eindeutig nachgewiesen. In 13 Isolaten gab es unterschiedliche Ergebnisse bei der Auswertung der beiden PCR-Methoden und 7 Isolate waren eindeutig negativ.

In einer Studie von KO et. al. (2004) über Sequenzanalysen von 7 verschiedenen Genen in der *Bacillus cereus* Gruppe werden 52 Stämme von *Bacillus cereus, Bacillus thurinigiensis* und *Bacillus anthracis* molekularbiologisch untersucht. Es erfolgte eine Sequenzierung der unterschiedlichen Genfragmente, unter anderem auch vom *gyrB* Gen. Die Untersuchungen zeigen, dass die einzelnen Genomsequenzen dieser 3 Bacillusarten eine sehr hohe Similarität aufweisen und eine Taxonomie der einzelnen Arten schwierig erscheint. Die maximale Sequenzdiversität der Nukleotide des *gyrB* Gens in den 3 verschiedenen Bacillusarten liegt laut KO et. al. (2004) bei 11,3%, wobei die Anzahl der variablen Aminosäuren bei nur 1% liegt.

Auch in dieser Arbeit wurde für die Detektion von *Bacillus cereus* auf Artebene als diagnostischer Marker das *gyrB* Gen herangezogen. Mit 2 verschiedenen Primerpaaren (PARK et. al., 2007; YAMADA et. al., 1999) wurden unterschiedliche Genfragmente des *gyrB* Gens amplifiziert. Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse bei 13 Isolaten (positiver Nachweis von *Bacillus cereus* bei der Methode nach PARK et. al. (2007), jedoch negatives Ergebnis bei der Methode nach YAMADA et. al. (1999), und umgekehrt) bestätigen die Schwierigkeit der Detektion von *Bacillus cereus* auf Artebene wie es auch in anderen Studien nachzulesen ist (KO et. al., 2004; PARK et. al., 2007; YAMADA et. al., 1999; CARLSON et. al., 1994; HELGASON et. al., 200; ASH et. al., 1991; SEGEEV et.al., 2005). Weitere molekularbiologische Untersuchungen wie Sequenzanalysen des 16S-23S Operons (HARRELL et. al, 1995) oder RFLP-Analysen (CHANG et. al., 2003) könnten speziell bei den 13 Isolaten mit unklarem Ergebnis mehr Aufschluss bringen.

5. Zusammenfassung

Der Grundgedanke dieser Studie war den mikrobiologischen Status einer repräsentativen Zahl von in Österreich verwendeten pflanzlichen Arzneimitteln von insgesamt 84 Proben aufzuzeigen. Die Untersuchungen umfassten klassische Methoden der Keimzahlbestimmung von Mikroorganismen und molekularbiologischer Detektionsmethoden.

Eine mikrobielle Belastung der pflanzlichen Arzneiproben konnte in 100% der aus China bezogenen Proben und in 51,7% der aus Österreich bezogenen Proben nachgewiesen werden, wobei die Werte der einzelnen mikrobiellen Parameter (aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, Hefe und Schimmelpilze, aerobe Sporenbildner, Enterokokken, Enterobakterien, koagulase-positive Staphylokokken, Laktobazillen und Clostridien) zwar teilweise an der oberen Grenze jedoch in keiner der untersuchten Proben über den vorgegebenen Richtwerten der Europäischen Pharmakopoe (2007) Kategorie 4A lagen. Auch die empfohlenen Grenzwerte der EHIA (2008) wurden eingehalten.

Aufgrund des ausgeprägten Vorhandenseins von aeroben Sporenbildnern in den in dieser Arbeit untersuchten Arzneipflanzen, erfolgte eine molekularbiologische Detektierung und Identifizierung von *Bacillus cereus* und *Bacillus cereus* Gruppe aus den auf Selektivnährboden kultivierten Isolaten. Für die Detektion von *Bacillus cereus* auf Artebene wurde als diagnostischer Marker das *gyrB* Gen herangezogen, der Nachweis der Arten der *Bacillus cereus* Gruppe erfolgte über das *groEL* Gen.

Aerobe Sporenbildner wurden in 96,4% der aus China bezogenen Arzneipflanzen und in 17,2% der aus Österreich bezogenen Proben kultiviert, aus welchen mittels unterschiedlicher PCR-Methoden in 36 der aus China bezogenen Proben *Bacillus cereus* eindeutig identifiziert werden konnte.

6. Abstract

The basis for the study was to establish the microbiological status for a representative number of herbal drugs in summary 84 samples which are applied in Austria. The investigation included the classical cultivation method of microorganisms as well as molecular-biological detection methods.

A microbiological contamination was shown in 100% of the plant material samples that originated in China and in 51.7% of those which originated in Austria. Although the values of the individual microbiological parameters (total aerobic mesophilic count, yeast and moulds, aerobic spore-forming count, enterococci, coagulase positive Staphylococci, lactobacillis and clostridia) were at the upper limit, they did not cross the limit of the standard values provided by the European Pharmacopoeia (2007) category 4A. The results also stayed within the recommended limits set by EHIA (2008).

Due to the high presence of aerobic spore-forming organisms within the pharmaceutical plant drugs that were investigated for this study, a further microbiological detection test for *Bacillus cereus* was performed. *Bacillus cereus*- and *Bacillus cereus* Group members were detected by using isolated colonies cultured on a selective medium. The gene, *gyrB*, was used to detect *Bacillus cereus* as a species and the verification of the types within the *Bacillus cereus* Group was performed using the *groEL* gene.

Aerobic mesophilic organisms could be cultured from 96.4% of herbal drugs received from China and in 17.2% of the samples that were received from Austria. With different molecular-biological detection methods *Bacillus cereus* could be precisely identified in 36 of the herbal medicinal drugs received from China.

7. Auflistung der Rohdaten

Tabelle 13: Rohdaten der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse (Proben aus Österreich)

Nähr-medium	PC	VRBD	YGC	Caso	Entero-coccosel	MRS	BP	DRCM	PEMBA
AT-Proben	GKZ	EB	Hefe/ Schimmel-pilze	Aerobe Sporen-bildner	EK	LB	Koag.+ Staph	Clostr.	*Bacillus*
AT1	1,00E+01	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT2	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT3	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT4	1,30E+02	*	*	1,00E+02	*	*	*	*	n.d.
AT5	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT6	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT7	2,90E+02	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT8	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT9	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT10	5,00E+00	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT11	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT12	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT13	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT14	8,00E+01	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT15	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT16	1,70E+03	*	1,50E+01	4,50E+02	*	*	*	*	zu wenig Probe
AT17	5,00E+00	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT18	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT19	1,00E+01	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT20	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT21	1,50E+01	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT22	4,00E+01	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT23	1,10E+02	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT24	5,00E+00	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT25	2,20E+03	*	*	8,00E+02	*	*	*	*	*
AT26	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT27	1,70E+02	*	*	2,00E+02	*	*	*	*	*
AT28	*	*	*	*	*	*	*	*	n.d.
AT29	1,30E+03	*	*	1,00E+03	*	*	*	*	5,00E+01

Tabelle 14: Rohdaten der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse (Proben aus China)

Nähr-medium	PC	VRBD	YGC	Caso	Entero-coccosel	MRS	BP	DRCM	PEMBA
China-Proben	GKZ	EB	Hefe/ Schimmel pilze	Aerobe Sporen-bildner	EK	LB	Koag.+ Staph.	Clostr.	*Bacillus*
CH1	9,50E+06	3,60E+04	3,00E+05	4,00E+06	1,00E+02	*	*	7,00E+01	5,00E+04
CH2	7,70E+06	2,50E+04	3,40E+05	2,00E+07	1,20E+04	1,00E+04	*	1,00E+02	*
CH3	4,00E+03	*	4,00E+01	2,30E+04	*	*	*	*	2,00E+02
CH4	8,10E+02	*	*	8,50E+02	*	1,00E+02	*	*	*
CH5	8,50E+03	*	*	5,00E+03	*	1,50E+02	*	*	*
CH6	2,10E+05	*	*	2,50E+05	*	1,50E+02	*	*	*
CH7	4,40E+02	*	*	3,00E+02	*	*	*	*	2,00E+02
CH8	9,00E+05	*	*	1,20E+06	*	*	*	*	3,00E+02
CH9	5,40E+05	4,00E+03	4,50E+03	2,90E+05	6,00E+02	3,00E+03	*	4,00E+01	2,00E+03
CH10	4,40E+05	*	1,00E+02	8,00E+04	*	*	*	2,50E+01	5,00E+02
CH11	1,40E+03	*	*	2,80E+03	*	*	*	1,50E+01	5,00E+02
CH12	2,00E+03	*	1,00E+01	1,10E+03	*	*	*	5,00E+00	3,00E+02
CH13	3,10E+03	*	3,00E+02	3,10E+03	*	7,00E+02	*	5,00E+00	1,00E+02
CH14	8,00E+03	*	2,50E+01	2,00E+03	*	*	*	*	1,00E+02
CH15	1,60E+04	*	1,50E+01	1,90E+03	*	*	*	2,50E+01	5,50E+02
CH16	3,20E+06	1,30E+03	3,50E+01	5,90E+06	*	2,00E+02	*	*	2,00E+04
CH17	1,60E+03	*	2,00E+01	1,50E+02	*	*	*	*	*
CH18	8,50E+01	*	*	*	*	*	*	*	*
CH19	4,00E+04	*	1,90E+02	1,80E+04	*	*	*	*	9,00E+02
CH20	1,80E+03	*	1,00E+03	2,90E+03	*	*	*	*	1,00E+02
CH21	1,80E+03	*	*	6,50E+02	*	*	*	*	1,80E+03
CH22	8,00E+03	*	1,50E+01	7,50E+02	*	*	*	*	1,00E+02
CH23	3,40E+04	*	1,50E+01	1,30E+03	*	*	*	2,00E+01	*
CH24	1,10E+04	*	*	1,10E+04	*	*	*	*	1,00E+02
CH25	7,50E+05	9,00E+02	2,00E+05	1,20E+04	1,00E+02	3,50E+02	*	2,50E+01	1,50E+03
CH26	5,40E+06	1,70E+04	6,50E+03	4,50E+04	4,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	9,50E+01	1,00E+03
CH27	7,50E+02	*	*	1,70E+03	*	1,00E+02	*	*	*
CH28	2,00E+02	*	1,50E+01	2,00E+02	*	*	*	*	*
CH29	4,10E+04	6,90E+02	7,00E+02	1,50E+04	*	*	*	*	1,80E+03
CH30	6,50E+03	*	*	3,00E+03	*	5,00E+01	*	*	8,50E+02
CH31	5,20E+03	*	1,50E+01	1,90E+03	*	*	*	*	3,00E+02
CH32	3,00E+03	*	5,50E+01	7,00E+02	*	*	*	*	1,50E+03
CH33	6,70E+03	*	7,50E+01	2,10E+04	*	1,00E+02	*	5,00E+00	1,00E+02
CH34	1,10E+04	*	*	3,40E+03	*	5,00E+01	*	*	5,00E+02
CH35	1,20E+02	*	5,00E+00	5,00E+01	*	*	*	*	*
CH36	1,60E+04	*	5,00E+01	2,00E+03	*	*	*	*	2,00E+03
CH37	8,70E+05	3,00E+01	3,00E+02	3,90E+04	*	*	*	*	1,00E+04

Tabelle 14: Rohdaten der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse (Proben aus China) (Fortsetzung)

Nähr-medium	PC	VRBD	YGC	Caso	Entero-coccosel	MRS	BP	DRCM	PEMBA
China-Proben	GKZ	EB	Hefe/ Schimmel pilze	Aerobe Sporen-bildner	EK	LB	Koag.+ Staph.	Clostr.	*Bacillus*
CH38	9,30E+05	4,00E+04	9,50E+04	1,70E+04	4,50E+03	*	*	1,50E+01	1,00E+02
CH39	2,50E+03	*	9,50E+02	9,00E+02	*	*	*	*	1,00E+03
CH40	4,60E+04	8,00E+02	1,80E+03	1,00E+03	*	*	*	*	1,00E+03
CH41	1,20E+05	1,20E+03	1,00E+02	3,30E+03	1,90E+04	*	*	*	1,00E+03
CH42	2,00E+02	*	*	*	*	*	*	*	5,00E+01
CH43	8,70E+05	3,60E+04	9,00E+01	8,80E+06	*	1,00E+02	*	*	3,30E+05
CH44	7,00E+03	*	*	3,30E+03	*	*	*	*	*
CH45	1,90E+04	*	5,00E+00	7,00E+03	*	1,00E+02	*	*	5,00E+02
CH46	1,60E+04	*	*	4,30E+03	*	*	*	*	5,00E+03
CH47	2,90E+03	*	7,50E+02	3,70E+03	*	*	*	2,50E+01	1,00E+02
CH48	4,70E+04	*	*	3,90E+04	*	1,50E+02	*	1,50E+01	4,90E+05
CH49	1,60E+05	*	5,00E+01	5,70E+04	*	5,00E+01	*	*	1,00E+04
CH50	3,60E+03	*	5,00E+01	2,90E+04	*	*	*	5,00E+00	1,00E+02
CH51	9,50E+02	*	1,00E+01	7,50E+02	*	*	*	5,00E+00	4,60E+03
CH52	1,10E+03	*	5,00E+00	4,00E+02	*	*	*	*	*
CH53	3,10E+03	*	*	8,00E+02	*	*	*	*	*
CH54	2,60E+04	*	*	1,50E+04	*	5,00E+01	*	*	5,00E+02
CH55	2,70E+03	*	4,50E+01	3,30E+03	*	*	*	*	1,00E+02

Legende:

PC	Plate Count Agar
VRBD	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar
YGC	Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar
MRS	DE MAN-ROGORSA-SHARPE-Agar
BP	Baird Parker-Agar
DRCM	Clostridien Differentialbouillon mit Agar
PEMBA	Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar
GKZ	aerobe mesophile Gesamtkeimzahl
EB	Enterobakterien
EK	Enterokokken
LB	Laktobazillen
AT	aus Österreich bezogene Proben
CH	aus China bezogene Proben
*	kein Wachstum in niedrigster Verdünnung
n.d.	nicht durchgeführt

Tabelle 15: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Isolate	PARK 1	YAMADA	PARK 2	CHANG
	Bacillus cereus	*Bacillus cereus*	*Bacillus cereus Gruppe*	*Bacillus cereus Gruppe*
CH 1/ 1	p*	p	p	p
CH 1/ 2	p	n	p	p
CH 3/ 1	n	n	p	p
CH 3/ 2	n	n	p	p
CH 7/ 1	p	p	p	p
CH 7/ 2	p	p	p	p
CH 8/ 1	p	p	p	p
CH 8/ 2	p	p	p	p
CH 9/ 1	n	n	p	p
CH 9/ 2	p	p	p	p
CH 10/ 1	p	p	p	p
CH 10/ 2	p	p	p	p
CH 11/ 1	p	p	p	p
CH 11/ 2	p	p	p	p
CH 12/ 1	n	n	p	p
CH 12/ 2	p	p	p	p
CH 13/ 1	p	p	p	p
CH 13/ 2	p	p	p	p
CH 14/ 1	n	n	p	p
CH 14/ 2	n	n	p	p
CH 15/ 1	p	p	p	p
CH 15/ 2	p	p	p	p
CH 16/ 1	p	p	p	p
CH 16/ 2	p	p	p	p
CH 19/ 1	p	p	p	p
CH 19/ 2	p	p	p	p
CH 20 /1	p	p	p	p
CH 21/ 1	p	p	p	p
CH 21/ 2	p	p	p	p
CH 22/ 1	p	p	p	p
CH 22/ 2	p	p	p	p
CH 24/ 1	p	p	p	p
CH 25/ 1	p	p	p	p
CH 25/ 2	p	p	p	p
CH 26/ 1	p	p	p	p
CH 26/ 2	n	p*	p	p
CH 29/ 1	p	p	p	p
CH 29/ 2	n	n	p	p
CH 30/ 1	p*	p	p	n
CH 30/ 2	p	p	p	p
CH 31/ 1	p	n	p	p
CH 31/ 2	p*	p	p	p
CH 32/ 1	p*	p	p	p
CH 32/ 2	p	p	p	p
CH 33/ 1	p	p	p	n
CH 34/ 1	p	p	p	p
CH 34/ 2	p	n	p	p
CH 36/ 1	n	p	p	p
CH 36/ 2	p	p	p	p
CH 37/ 1	n	p	p	p
CH 37/ 2	n	p	p	p
CH 38/ 1	p	p	p	p

Tabelle 15: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen (Fortsetzung)

Isolate	PARK 1	YAMADA	PARK 2	CHANG
	Bacillus cereus	***Bacillus cereus***	***Bacillus cereus Gruppe***	***Bacillus cereus Gruppe***
CH 39/ 1	p	n	p	p
CH 39/ 2	p	p	p	p
CH 40/ 1	p	p	p	p
CH 40/ 2	p	p	p	p
CH 41/ 1	n	p	p	p
CH 41/ 2	p	n	p	p
CH 42/ 1	p	p	p	p
CH 43/ 1	p	p	p	p
CH 43/ 2	p	p	p	p
CH 45/ 1	p	p	p	p
CH 45/ 2	p	p	p	p
CH 46/ 1	p	p	p	p
CH 46/ 2	p	p	p	p
CH 47/ 1	p	p	p	p
CH 47/ 2	p	p	p	p
CH 48/ 1	p	p	p	p
CH 48/ 2	p	p	p	p
CH 49/ 1	p	p	p	n
CH 49/ 2	p	p	p	p
CH 50/ 1	n	p*	p*	n
CH 50/ 2	p	n	p	p
CH 51/ 1	p	p	p	p
CH 51/ 2	p	p	p	p
CH 54/ 1	p	p	p	p
CH 54/ 2	p	p	p*	p
CH 55/ 1	p	p	p	p
CH 55/ 2	n	p*	n	n
AT 29/ 1	n	n	n	n
Bc 57	p	p	p	p
Bc 58	p*	p	p*	p
Bc 59	p*	p	p	p
Neg.Ko.	n	n	n	n

Legende:

AT	aus Österreich bezogene Proben
CH	aus China bezogene Proben
p	positiv
p*	schwach positiv
n	negativ
Bc 57, Bc 58, Bc 59	*Bacillus cereus* Kontrollstämme
Neg.Ko.	negative Kontrolle

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alismatis rhizoma…….23
Abbildung 2: Annemarrhenae rhizoma……..23
Abbildung 3: Saposhnikoviae radix…….24
Abbildung 4: Cinnamomi cassiae ramulus…….24
Abbildung 5: Aucklandiae radix……..……25
Abbildung 6: Curcuma radix……25
Abbildung 7: Zizyphi spinosae semen……26
Abbildung 8: Menthae herba……..…….26
Abbildung 9: Toosendan fructus…….27
Abbildung 10: Pinelliae rhizoma……..27
Abbildung 11: Mori folium…….28
Abbildung 12: Uncariae ramulus et uncus…….28
Abbildung 13: Prunella spica……29
Abbildung 14: Puerariae thomsonii radix……..…….29
Abbildung 15: Angelicae dahuricae radix……..30
Abbildung 16: Paeonia radix alba……30
Abbildung 17: Artemisiae scopariae herba……...….31
Abbildung 18: Astragali radix……..…….31
Abbildung 19: Angelicae sinensis radix……..32
Abbildung 20: Bupleuri radix……..…..……32
Abbildung 21: Citri reticulatae pericarpium……...33
Abbildung 22: Carthami flos…….33
Abbildung 23: Codonopsis radix……..34
Abbildung 24: Chuanxiong rhizoma……..…..34
Abbildung 25: Cyperi rhizoma……..35
Abbildung 26: Glehniae radix……..…….35
Abbildung 27: Gardeniae fructus…….36

Abbildung 28: Isatidis radix…….36
Abbildung 29: Jujubae fructus…….37
Abbildung 30: Lonicerae flos……37
Abbildung 31: Ligustri lucidi fructus……..…..38
Abbildung 32: Leonuri herba……38
Abbildung 33: Moutan cortex……..……39
Abbildung 34: Magnoliae flos……..39
Abbildung 35: Ophiopogonis radix……..40
Abbildung 36: Phellodendri cortex……..……40
Abbildung 37: Poria alba……..41
Abbildung 38: Scrophulariae radix……..41
Abbildung 39: Scutellariae radix……..42
Abbildung 40: Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma……...42
Abbildung 41: Rhei radix et rhizoma……..…….……43
Abbildung 42: Glycyrrhizae radix……43
Abbildung 43: Cibotii rhizoma……..……44
Abbildung 44: Coptidis rhizoma……..44
Abbildung 45: Ephedra herba……..45
Abbildung 46: Ginseng radix…….……..……45
Abbildung 47: Sparganii rhizoma…….……..…….46
Abbildung 48: Persicae semen……46
Abbildung 49: Coices semen……..…….47
Abbildung 50: Polygonati rhizoma……..…47
Abbildung 51: Notoginseng radix……..…….……48
Abbildung 52: Dioscorae rhizoma…….……..48
Abbildung 53: Rhemannia radix praeparata……..49
Abbildung 54: Atractylodis macrocephalae rhizoma…….……..…….49
Abbildung 55: Keimwachstum auf Plate Count-Agar……..63
Abbildung 56a: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (Proben aus China)…..……64
Abbildung 56b: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (Proben aus Österreich)…..…..64
Abbildung 57: Keimwachstum auf YGC-Agar……..……65
Abbildung 58a: Keimzahl der Hefen und Schimmelpilze (Proben aus China)……..…66
Abbildung 58b: Keimzahl der Hefen und Schimmelpilze (Proben aus Österreich)….66
Abbildung 59: Keimwachstum auf VRBD-Agar……...67

Abbildung 60: Fermentationstest……67
Abbildung 61: Keimzahl der Enterobakterien (Proben aus China)……68
Abbildung 62: Keimwachstum auf Enterococcosel……..……69
Abbildung 63: Keimzahl der Enterokokken (Proben aus China)……...70
Abbildung 64: Keimzahl der Lactobazillen (Proben aus China)……..…..71
Abbildung 65: Keimzahl der koagulase-positiven Staphylokokken (Proben aus China)……72
Abbildung 66: Keimwachstum auf DRCM-Agar……...73
Abbildung 67: Keimzahl der anaeroben Sporenbildner (Proben aus China)……..…74
Abbildung 68: Keimwachstum auf CASO-Agar……....75
Abbildung 69a: Keimzahl der aeroben Sporenbildner (Proben aus China)…..……76
Abbildung 69b: Keimzahl der aeroben Sporenbildner (Proben aus Österreich)……..76
Abbildung 70: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Wurzeln“...77
Abbildung 71: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Samen“….78
Abbildung 72: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Blüten“…..79
Abbildung 73: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Blätter“…..79
Abbildung 74: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Früchte“…80
Abbildung 75: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl aller Proben der Art „Zweige“….81
Abbildung 76: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl der Proben vergleichend nach der Bezugsquelle……..……..83
Abbildung 77: Keimzahl der aeroben Sporenbildner in den Proben vergleichend nach der Bezugsquelle (isoliert auf CASO-Agar)……..84
Abbildung 78: Keimzahl der aeroben Sporenbildner in den Proben vergleichend nach der Bezugsquelle (isoliert auf PEMBA-Agar)……..……85
Abbildung 79: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach PARK)……..……..87
Abbildung 80: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach PARK)……..……..87
Abbildung 81: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach PARK)……..……..88
Abbildung 82: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach PARK)……..……..89
Abbildung 83: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach PARK)……..……..90

Abbildung 84: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach PARK)……..……..90
Abbildung 85: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach PARK)……..……..91
Abbildung 86: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach CHANG)……..……..92
Abbildung 87: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach CHANG)……..……..93
Abbildung 88: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach CHANG)……..……..93
Abbildung 89: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkts (nach CHANG)……..……...94
Abbildung 90: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach YAMADA)……..……..95
Abbildung 91: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach YAMADA)……..……96
Abbildung 92: Gelelektrophorese des *Bacillus cereus*-PCR-Produkts (nach YAMADA)……..……96
Abbildung 93: Gelelektrophorese der *Bacillus cereus*-und *Bacillus cereus* Gruppe-PCR-Produkte ……..……97

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der untersuchten Drogen……..…..20-22
Tabelle 2: Verwendete Nährmedien……..…….……54
Tabelle 3: Primer für *Bacillus cereus* Gruppe…...……..…….……57
Tabelle 4: Primer für *Bacillus cereus* …….57
Tabelle 5: Protokoll für *Bacillus cereus* Gruppe-PCR nach Chang 2003…….58
Tabelle 6: Protokoll für *Bacillus cereus*-PCR nach Yamada 1999…….59
Tabelle 7: Protokoll für *Bacillus cereus* Gruppe-und *Bacillus cereus*-PCR nach Park 2007…….…..59
Tabelle 8: Grenzwerte der mikrobiellen Qualität pharmazeutischer Zubereitungen gemäß Europäischer Pharmakopoe, 2007……..62
Tabelle 9: Empfohlene mikrobiologische Spezifikation für den Handel mit Rohmaterial zur Herstellung von teeähnlichen Erzeugnissen gemäß EHIA, 2008, Kapitel VII…….62
Tabelle 10: Auflistung der 28 gleichen Arzneipflanzen unterschiedlicher Bezugsquelle……..81-82
Tabelle 11: Keimzahlbereiche der einzelnen Parameter in den untersuchten Proben bezogen aus China…….....101
Tabelle 12: Keimzahlbereiche der einzelnen Parameter in den untersuchten Proben bezogen aus Österreich…….101
Tabelle 13: Rohdaten der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse (Proben aus Österreich)……..……..……....103
Tabelle 14: Rohdaten der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse (Proben aus China)……..……..109-110
Tabelle 15: Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen…….……111-115

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AT	Protokollierung der Proben bezogen aus Österreich
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA
A. dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
CH	Protokollierung der Proben bezogen aus China
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	„et alii“ (und andere [Autoren]; bei Literaturzitaten)
g	Gramm
h	Stunde
ISO	International Organization of Standardization
KBE/ml	Koloniebildende Einheiten pro Milliliter
KZ	Keimzahl
l	Liter
LMG	Laboratorium voor Microbiology Gent, Belgium
log	dekadischer Logarithmus
min	Minute/-n
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmol	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
pmol/µl	Pikomol pro Mikroliter
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rhz.	rhizoma
rx.	radix

UHQ-Wasser	„Ultra high qualitiy“- Wasser
U/min	Umdrehungen pro Minute
µl	Mikroliter
v. Chr.	vor Christus
n. Chr.	nach Christus
%	Prozent
>	größer als
°C	Grad Celsius

11. Literaturverzeichnis

ALONZO V., MONFORTE M. T., TUMINO G., RAGUSA S., BISIGNANO G. (1994), A note on the microbial contamination of medicinal plants. Pharmeuropa, 6: 47-55

ANDERSEN G. L., SIMEHOCK J. M., WILSON K. H. (1996), Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. Journal of Bacteriology 178: 377-384

ANDREWS J. H., KENERLEY G. M., NORDHEIM V. (1980), Positional variation in phylloplone microbial populations within an appletree canopy. Microbiolocal Ecology, 6: 71

ANONYMUS: SCHWEIZER BERUFSORGANISATION FÜR TRADITIONELLE CHINESISCHE MEDIZIN (2006), Handbuch der Schweizerischen Berufsorganisation für traditionelle Chinesische Medizin (SBO-TCM), 10. Auflage, CH- 9113 Degersheim

ASH C., FARROW J. A., DORSCH M., STACKEBRANDT E., COLLINS M. D. (1991), Comparative analysis of *Bacillus anthracis, Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. International Journal of Systematic Bacteriology 41: 343-346

AZIZ N. H., YOUSSEF Y. A., El-FOULY M. Z., MOUSSA L. A. (1998), Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. Botanical Bulletin of Academia Sinicia 39: 279-285

BAXTER R., HOLZAPFEL H. (1982), A microbial investigation of selected spices, herbs, and additives in South Africa. Journal of Food Science 47: 570-578

BECKMANN G., KÖSZEGI D., SONNENSCHEIN B., LEIMBECK R. (1996), Zum mikrobiologischen Status von Kräutern und Gewürzen. Fleischwirtschaft 76: 240-243

BECKMANN G., KROTH E., BOMBLIES L., LEIMBECK R., SONNENSCHEIN B. (2003), An investigation into the microflora of medicinal plants during growth and harvesting- the plant-associated microflora of melissa, valerian and parsley include Enterobacteria. Pharmeuropa 15 (2): 291-298

BECKMANN G., KUGLER F., SONNENSCHEIN B. (1996), Experimentelle Untersuchungen zur antimykotischen Wirksamkeit eines Myrrhe, Kamillenextrakt und Kaffeekohle enthaltenden Arzneimittels. Erfahrungsheilkunde 45; 842-847

BECKMANN G., THIEDE S., SONNENSCHEIN B. (2003), Mikroflora von Arznei- und Gewürzpflanzen. Proceedings 13. Bernburger Winterseminar zu Fragen der Arznei- und Gewürzpflanzenproduktion 25.-26. 2. 2003, Bernburg/Saale, 24-25

BUNDESGESETZBLATT für die Republik Österreich, Jahrgang 2006, 13. Bundesgesetz: Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz- LMSVG, 2. Abschnitt, § 9: Behandlung mit ionisierenden Strahlen

CARLSON C. R., CAUGANT D., KOLSTO A. (1994), Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. Applied and Environmental Microbiology 60: 1719-1725

CHAN K. (2003), Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. Chemosphere, Environment and Public Health Management 52 (9): 1361-1371

CHANG Y.-H., SHANGKUAN Y.-H., LIN H.-C., LIU H.-W. (2003), PCR-Assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. Applied and Environmental Microbiology, 69 (8), 4502-4510

DEBOER E., SPIEGELENBURG W. M., JANSSEN F. W. (1985), Microbiology of spices and herbs. Antonie van Leeuwenhoek 51: 435-438

DROBNIEWSKI F. A. (1993) *Bacillus cereus* and related species. Clinical Microbiological Review 6: 324-338

EHLING-SCHULZ M., FRICKER M., SCHERER S. (2004), Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. FEMS Microbiological letters 232: 189-195

EISGRUBER H. und REUTER G., (2003), Anaerobe Sporenbildner in handelsüblichen Gewürzen und Ausgangsmaterialien für tischfertige Lebensmittel. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung 185: 281-287

Europäische Pharmacopoe (2007), Kapitel 5.1.4.Mikrobiologische Qualität pharmazeutischer Zubereitungen. 5. Ausgabe, Nachtrag, 2000, 370-1

European Herbal Infusion Association (EHIA), 2008, Kapitel VII: Empfohlene Mikrobiologische Spezifikation für den Handel mit Rohmaterial zur Herstellung von teeähnlichen Erzeugnissen.

FELIS G. E., DELLAGLIO F. (2007), Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. Current Issues in Intestinal Microbiology 8: 44-61

FETT W. F. (2000), Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. Food Protection, 63: 625-632

FOCKS C., BÄCKER M., HILLENBRAND N. (2006), Leitfaden der chinesischen Medizin. Veröffentlicht von Elsevier GmbH Deutschland, ISBN: 343756482X

HABERER K., Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Nachweis spezifischer Mikroorganismen; in HARTKE K., HARTKE H., MTSCHLER E., RÜCKER G., WICHTL M. (1999), Kommentar zum europäischen Arzneibuch, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft/ Eschborn, Govi- Verlag- Pharmazeutischer Verlag GmbH., 2.6.13: 1-5

HAHN G. (1984), Enterokokken: Ihre Bedeutung als Krankheitserreger, Indikatorkeime und Starterkulturen im Bereich der Lebensmittelhygiene in: Neue Erkenntnisse über die Erreger bakterieller Lebensmittel-Infektionen. Schweizer Gesellschaft für Lebensmittelhygiene, Schriftenreihe 14, 67-82

HALT M. (1998), Moulds and Mycotoxins in herb teas and medicinal plants. European Journal of Epidemiology 14: 269

HARTWIG H., SCHLÖSSER A., RABSCH W., BECKMANN G. (2006), Salmonellen in Kräutern und Gewürzen. Fleischwirtschaft 3: 150-154

HARRELL L. J., ANDERSEN G. L., WILSON K. H. (1995), Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. Journal of clinical Microbiology 33: 1847-1850

HÄRTLING C. (1983), Untersuchungen über den mikrobiellen Zustand von Laxantien auf pflanzlicher Basis. Pharmazeutische Zeitung 128; 1006-1008

HECKER H. U., PEUKER E. T., STEVELING A., KLUGE H. (2003), Handbuch traditionelle chinesische Medizin. Georg Thieme Verlag, ISBN: 3830420765

HELGASON E., OKSTAD O. A., CAUGANT D. A., JOHANSEN H. A., FOUET A., MOCK M., HEGNA I., KOLSTO A. B. (2000), *Bacillus anthracis, Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. Applied and Environmental Microbiology 66: 2627-2630

HEMPEN C. H., FISCHER T. (2007), Leitfaden chinesische Phytotherapie: Einschließlich mineralischer und tierischer Arzneien. Elsevier GmbH Deutschland, ISBN 3437559915

HOU J. P., JIN Y. (2005), The Healing Power of Chinese Herbs and Medicinal Recipes. Veröffentlicht von Haworth Press, ISBN: 0789022028

IHRIG M., KAUNZINGER A., BAUMANN J., ORBIG H., REISINGER K., SCHÄFER R., SCHOLL C. (2004), Qualitätsmängel bei TCM-Drogen. Ergebnisse des Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker, Pharmazeutische Zeitung 149 (43), 40-47

KABELITZ L. (2007), Entkeimungsverfahren für Kräuter und Gewürze. DLG Wintertagung vom 10. Januar 2007, Referat

KEIM P., KALIF A., SCHUPP J., HILL K., TRAVIS S. E., RICHMOND K., ADAIR D., M., HUGH-JONES M., KUSKE C. R., JACKSON P. (1997), Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragmernt length polymorphism markers. Journal of Bacteriology 179: 818-824

KNEIFEL W., CZECH E., KOPP B. (2002) Microbial contamination of medicinal plants- a review. Planta Medica 68, 5-15

KO K. S., KIM J.-W., KIM J.-M., KIM W., CHUNG S.-I., KIM I. J., KOOK Y.-H. (2004), Population Structure of the *Bacillus cereus* Group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. Infection and Immunitiy, September 2004, Volume 72, No. 9, 5253-5261

LEIMBECK R. (1987), Teedrogen - Wie steht es mit der mikrobiologischen Qualität? Deutsche Apothekerzeitung 127; 1221-1226

LEUNG A.Y.(1993), Chinesische Heilkräuter. Eugen Diederich Verlag, 3. Auflage, ISBN: 342400796-X

LIAO Y. (2006), Traditional Chinese Medicine. Veröffentlicht von China International Press, ISBN: 7508509609

LIMYATI D. A., JUNIAR B. L. L. (1998), Jamu Gendong, a kind of traditional medicine in Indonesia: the microbial contamination of its raw materials and endproduct. Journal of Ethnopharmacology 63: 201-208

MADIGAN M. T., MARTINKO J. M., PARKER J. (2001) „BROCK Mikrobiologie“, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN: 3-8274-0566-1

MAKI D., AGGER W. (1998), Enterococcal bacteremia: Clinical features, the risk of endocarditis, and management. Medicine 67, 246-249

MARTINS H. M., MARTINS M. L., DIAS M. I., BERNARDO F. (2001), Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. International Journal of Food Microbiology, 68: 149-153

MERCIER J., LINDOW S. E. (2000), Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacteriological epiphytes. Applied and Environmental Microbiology, 66: 369-374

MORRIS C. E., MONIER J. M., JACQUES M. A. (1997), Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 63; 1570-1576

MOSSEL D., BIJKER P., EELDERING I. (1978), Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in Lebensmitteln und Trinkwasser – Ihre Bedeutung, Erfassung und Bekämpfung. Arch. Lebensmittelhygiene 39, 121-127

MULLIS K. B. (1993), The polymerase chain reaction. Nobel lecture, December 8 www.nobel.se/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture

MÜLLER T., ULRICH E. M., MÜLLER M. (2001), Identification of plant-associated enterococci. Journal of Applied Microbiology 91, 268-278

MURRAY B. (1990), The life and times of *Enterococcus.* Clinical Microbiological Review 3, 46-65

PARK S. H., HYUN-JOONG K., JAE-HWAN K., TAE-WOON K., HAE-YEONG K. (2007), Simultaneous Detection and Identification of *Bacillus cereus* group Bacteria using Multiplex PCR. Journal of Microbiological Biotechnology 17(7), 1177-1182

PECORARO S., BUCHER E. (2002,) Rapid identification of closely related probiotic *Bacillus cereus* strains and differentiation from wild type bacilli. Archiv für Lebensmittelhygiene 53: 52-59

PETERSEN D. J., SHISHIDO M., HOLL F. B., CHANWAY C. P. (1995), Use of species-and strain-specific PCR primers for identification of conifer root-associated *Bacillus ssp*. FEMS Microbiological Letters 133: 71-76

SERGEEV N., DISTLER M., VARGAS M., CHIZHIKOV V., HEROLD K. E., RASOOLY A. (2005), Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. Journal of Microbiological Methods 65: 488-502

SOUMYANATH A. (2006), Traditional Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants. CRC Press, ISBN 0415334640

THIEDE S., BECKMANN G. (2004a), Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae* auf Arzneipflanzen.1. Mitteilung: Literaturübersicht. Zeitschrift für Arznei-und Gewürzpflanzen 9 (2): 63-71

THIEDE S., BECKMANN G. (2004b), Mikroflora von Arzneipflanzen-Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae*. Zeitschrift für Arznei-und Gewürzpflanzen 9 (3): 130-140

THIEDE S., BECKMANN G., KROTH E., SONNENSCHEIN B. (2002), Mentaler Kurzschluß: Enterobakterien auf Arzneipflanzen. Swiss Pharma 24 (9a): 8-12

TURNBULL P. C., HUTSON R. A., WARD M. J., JONS M. N., QUINN C. P., FINNIE n. J., DUGGLEBY C. J., KRAMER J. M., MELLING J. (1992) *Bacillus anthracis* but not always anthrax. Journal of Applied Bacteriology 71: 21-28

WU Y. (2005), Ernährungstherapie mit chinesischen Kräutern. Veröffentlicht von Elsevier GmbH, ISBN: 3437571605

YAMADA S., OHASHI E., AGATA N., VENKATESWARAN K. (1999), Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of gyrB of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, and *Bacillus anthracis* and their application to the detection of *Bacillus cereus* in rice. Applied and Environmental Microbiology 65 (4), 1483-1490

ZHU Y.-P. (1998), Chinese Materia Medica: Chemistry, pharmacology and applications. Veröffentlicht von CRC Press, The Netherlands,SBN: 9057022850

12. Curriculum vitae

Ortner Birgit

Persönliche Daten:

Adresse:	Wien, 9. Bezirk
Email:	birgit.ortner@ages.at
Geburtsdatum,-ort:	22.06.1971, Offenburg, BRD
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Ausbildung:

1977-1981:	Volksschule, Klagenfurt
1981-1990:	Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium, Klagenfurt
13.06.1990:	Reifeprüfung
1990-1992:	Akademie für med. techn. Fachdienst, Klagenfurt
18.12.1992:	Diplomierung
Seit 2000:	Studium Biologie, Studienrichtung Mikrobiologie und Genetik

Berufliche Erfahrungen:

Seit 1992:	Tätigkeit als diplomierte medizinische Bioanalytikerin an der AGES Wien, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, 1090 Wien
1992-1994:	Tätigkeit im Referenzlabor für Tuberkulose, AGES Wien
1994-1996:	Tätigkeit im Bereich allgemeine Mikrobiologie, AGES Wien

Seit 1996: Tätigkeit im Referenzlabor für Polioviren, AGES Wien und im Referenzlabor für Legionellen, AGES Wien

Wissenschaftliche Arbeiten:

Juli-September 2007:
Mitarbeit an einem Projekt an der Universität für Bodenkultur Wien, Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene
Thema: Effects of silage or probiotics on performance and gut microbial composition of organic growing-finishing pigs

Oktober 2007-Dezember 2008:
Diplomarbeit an der Universität für Bodenkultur Wien, Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene
Thema: Hygienestatus und mikrobiologische Sicherheit von Kräutern zur Verwendung in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM)

2007-2008:
Publikation: ORTNER B., HUANG C.-W., SCHMID D., MUTZ I., WEWALKA G., ALLERBERGER F., YANG J.-Y., HUEMER H.-P. (in press), Epidemiology of enterovirus types causing neurological disease in Austria 1999-2007: Detection of clusters of echovirus 30 and enterovirus 71 and analysis of prevalent genotypes. Journal of medicinal Virology, Februar 2009

Juli-September 2008:
Artikel: HUEMER H.-P., ORTNER B., HUANG C.-W., SCHMID D., MUTZ I., WEWALKA G., YANG J.-Y., ALLERBERGER F. (2008), Isolating asian enterovirus 71 subgenogroup C4 in two austrian clinical sample from 2004. Eurosurveillance Vol.13, Issues 7-9