

DIN EN 17707



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-05-31
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17707:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Bestimmung des Gehalts an Hefen und Schimmelpilzen;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17707:2023**

Plant biostimulants –
Determination of the yeast and mould content;
German and English version prEN 17707:2023

Biostimulants des végétaux –
Détermination de la teneur en levures et en moisissures;
Version allemande et anglaise prEN 17707:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-03-31 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 49 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17707:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-06 AA „Pflanzen-Biostimulanzien“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN CEN/TS 17707:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Veröffentlichungsform von einer Technischen Spezifikation zur Europäischen Norm;
- b) Ergänzung informativen Anhangs C mit Ringversuchsdaten zur Wiederhol- und Vergleichpräzision des Verfahrens;
- c) Ergänzung informativen Anhangs ZA zum Zusammenhang mit Verordnung für EU-Düngeprodukte.

April 2023

prEN 17707

Pflanzen-Biostimulanzien – Bestimmung des Gehalts an Hefen und Schimmelpilzen

Plant biostimulants – Determination of the yeast and mould content

Biostimulants des végétaux – Détermination de la teneur en levures et en moisissures

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
4.1 Allgemeines	8
4.2 Plattenzählverfahren	8
5 Verdünnungsmittel und Nährmedien	8
5.1 Allgemeines	8
5.2 Verdünnungsmittel	9
5.3 Nährmedien	9
6 Geräte und Glasgeräte	9
7 Handhabung von Pflanzen-Biostimulanzien und Probenahme	9
8 Durchführung	9
8.1 Allgemeines	9
8.2 Prüfmenge und Erstverdünnung	10
8.2.1 Allgemeines	10
8.2.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen	10
8.2.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)	10
8.2.4 Feststoff – als wasserdispergierbares Pulver (WP) formuliert	10
8.2.5 Feststoff – als wasserdispergierbares Granulat (WDG) formuliert	10
8.2.6 Feststoff – als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert	10
8.2.7 Feststoff – Substrat	10
8.3 Reihenverdünnungen	10
8.4 Plattenzählverfahren	11
8.4.1 Gussplattenverfahren	11
8.4.2 Oberflächenausstrichverfahren (Spatelplattenverfahren/Ausstreichverfahren)	11
8.4.3 Bebrütung	11
9 Zählung der Kolonien	12
10 Angabe der Ergebnisse	12
10.1 Berechnungsverfahren	12
10.2 Interpretation	13
11 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Verdünnungsmittel	15
A.1 Allgemeines	15
A.2 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	15
A.2.1 Zusammensetzung	15
A.2.2 Herstellung	15
Anhang B (normativ) Nährmedium	16
B.1 Allgemeines	16
B.2 Sabouraud-Dextrose-Chloramphenicol-Agar (SDCA)	16
B.2.1 Zusammensetzung	16
B.2.2 Herstellung	16
B.3 Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA, en: Potato dextrose agar) mit Antibiotika	17
B.3.1 Zusammensetzung	17
B.3.2 Herstellung	17
B.4 Glucose-Pepton-Agar (GP-Agar) mit Antibiotika	17
B.4.1 Zusammensetzung	17
B.4.2 Herstellung	17
B.5 Malzextrakt-Agar (MEA) mit Antibiotika	18

B.5.1	Zusammensetzung	18
B.5.2	Herstellung	18
Anhang C	(informativ) Ringversuch	19
C.1	Im Ringversuch verwendete Materialien	19
C.2	Ergebnisse des Ringversuchs	20
Anhang ZA	(informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2019/1009 zur Bereitstellung von EU-Düngeprodukten auf dem Markt	22
Literaturhinweise		23

Tabellen

Tabelle 1	— Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien [1]	5
Tabelle C.1	— Im Ringversuch untersuchte Probenarten	19
Tabelle C.2	— Codes für Proben und hinzugefügte lyophilisierte Fläschchen, die mit dem Titer jedes Fläschchens geprüft wurden	19
Tabelle C.3	— Ergebnisse	20
Tabelle ZA.1	— Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	22

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17707:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN/TS 17707:2022 ersetzen.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinie(n)/Verordnung(en).

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinie(n)/Verordnung(en) siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

Einleitung

Dieses Dokument wurde von den Experten des CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet. Das Europäische Komitee für Normung (CEN) wurde von der Europäischen Kommission (EC) beauftragt, Europäische Normen bzw. europäische Normungsergebnisse zu verfassen, die der Umsetzung der Verordnung (EU) 2019/1009 vom 5. Juni 2019 mit Vorschriften für die Bereitstellung von EU-Düngeprodukten auf dem Markt („Düngeprodukteverordnung“) dienen sollen.

Dieser Normungsauftrag, vorgestellt als SR M/564 und M/564/Amd1, ist auch ein Beitrag zur Strategie „Innovating for Sustainable Growth: A Bio economy for Europe“. Im Rahmen dieses Auftrags wurde die Arbeitsgruppe 5 „Kennzeichnung und Bezeichnungen“ (en: Labelling and denominations) gebildet, um ein Arbeitsprogramm zu entwickeln. Das Technische Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ wurde eingerichtet, um dieses Arbeitsprogramm auszuführen, wobei eine Normenreihe erarbeitet wird. Das Interesse an Biostimulanzien als wertvolles Hilfsmittel für die Landwirtschaft ist in Europa deutlich gestiegen. Es wurde erkannt, dass der Normung eine wichtige Rolle zukommt, wenn es darum geht, den Einsatz von Biostimulanzien zu fördern. Die Arbeit des CEN/TC 455 ist darauf ausgerichtet, die Zuverlässigkeit der Lieferkette zu verbessern und so das Vertrauen von Landwirten, Industrie und Verbrauchern in Pflanzen-Biostimulanzien zu stärken, und wird die Kommerzialisierung der europäischen Biostimulanzienindustrie fördern und unterstützen.

Biostimulanzien, die in der Landwirtschaft eingesetzt werden, können auf vielfältige Weise angewendet werden: auf dem Boden, auf der Pflanze, als Samenbehandlung usw. Ein mikrobielles Pflanzen-Biostimulans besteht aus einem Mikroorganismus oder einem Konsortium von Mikroorganismen, wie in der Komponentenkategorie 7 des Anhangs II der EU-Düngeprodukteverordnung angegeben.

Dieses Dokument ist für alle mikrobiellen Biostimulanzien in der Landwirtschaft anwendbar.

Tabelle 1 fasst viele der agrarökologischen Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien zusammen.

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien [1]

Erhöhung der Biodiversität
durch Verbesserung der Qualität/Quantität der Mikroorganismen im Boden
Stärkung biologischer Regulations- und Wechselwirkungsmechanismen
durch Verstärkung der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen
— symbiotischer Austausch, d. h. <i>Mycorrhizae</i>
— symbiotischer Austausch, d. h. <i>Rhizobiaceae/Fabaceae</i>
— Sekrete, die Pflanzenhormone nachahmen (d. h. <i>Trichoderma</i>)
durch Regulierung pflanzenphysiologischer Prozesse
— zum Beispiel Wachstum, Stoffwechsel, Pflanzenentwicklung ...
Verbesserung der biogeochemischen Kreisläufe
— Verbesserung der Aufnahme von Nährstoffelementen
— Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffelementen im Boden
— Stimulierung des Abbaus organischer Substanz

WARNUNG — Personen, die dieses Dokument anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, alle gegebenenfalls zutreffenden Sicherheitsprobleme im Zusammenhang mit seiner Anwendung zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, geeignete Vor-

sichtsmaßnahmen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und die Einhaltung nationaler Vorschriften sicherzustellen.

WICHTIG — Es ist unerlässlich, dass nach diesem Dokument durchgeführte Prüfungen von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein horizontales Verfahren zur Zählung von Hefen und Schimmelpilzen in Pflanzen-Biostimulanzien, die zur Verwendung in der Landwirtschaft bestimmt sind, mithilfe des Koloniezählverfahrens nach aerober Bebrütung bei $(25 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ fest.

Dieses Dokument hat die Zählung von Hefen und Schimmelpilzen in technischen und formulierten Pflanzen-Biostimulanzien, die im flüssigen oder im festen Zustand vorliegen können, zum Gegenstand. Das Verfahren ist auf mikrobielle Pflanzen-Biostimulanzien anwendbar, ausgenommen jene, die aus Pilzen oder Hefe bestehen, um zu überprüfen, dass die Konzentration von Hefen und Schimmelpilzen die jeweiligen Grenzwerte, die in der EU-Düngeprodukteverordnung [1] angegeben sind, nicht überschreitet.

Gegebenenfalls können die gezählten Hefen und Schimmelpilze durch geeignete Identifizierungsprüfungen identifiziert werden.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Hefe

mesophiler aerober Mikroorganismus, der unter Verwendung eines mykologischen Agarmediums unter den in diesem Dokument beschriebenen Bedingungen matte oder glänzende runde Kolonien (3.3) auf der Oberfläche des Mediums entwickelt, die gewöhnlich einen regelmäßigen Umriss und eine mehr oder weniger konvexe Oberfläche haben

3.2

Schimmelpilz

mesophiler aerober fadenförmiger Mikroorganismus, der auf der Oberfläche eines mykologischen Agarmediums unter den in diesem Dokument beschriebenen Bedingungen für gewöhnlich flache oder flauschige, sich ausbreitende Kolonien (3.3) entwickelt, die häufig Sporen oder Konidien produzieren

3.3

Kolonie

lokalisierte sichtbare Anhäufung mikrobiologischer Masse (wie Prokaryoten, Bakterien, Mikromyceten, Hefen und Pilze) oder Organismen (wie Dreissena-Arten), ausgehend von einem lebensfähigen Partikel oder Organismus auf oder in einem festen Nährmedium

Anmerkung 1 zum Begriff: Häufig verschmelzen Mikrokolonien aus nahegelegenen lebensfähigen Partikeln, bevor sie sichtbar werden, zu einer Makrokolonie. Die Anzahl der sichtbaren Kolonien ist daher meist eine Unterschätzung der Anzahl der lebensfähigen Partikel.

[QUELLE: [ISO 6107-6:2021, 3.119 [4]]

3.4

Produkt

Anteil eines identifizierten Pflanzen-Biostimulansprodukts, das im Labor zum Prüfen entgegengenommen wird

3.5

Probe

Anteil des Produkts (3.4), der bei der Prüfung zur Herstellung der Erstverdünnung eingesetzt wird

3.6

Erstverdünnung

Suspension (oder Lösung) der Probe (3.5) in einem festgelegten Volumen eines geeigneten Verdünnungsmittels

3.7

Probenverdünnung

Verdünnung der Erstverdünnung (3.6)

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Dieses Verfahren zielt auf die Zählung von Kolonien auf einem selektiven Agarmedium ab.

4.2 Plattenzählverfahren

Die Plattenzählung setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

- Herstellung von gegossenen Platten oder Ausstrichplatten mit einem spezifischen Nährmedium. Je nach erwarteter Koloniezahl wird eine bestimmte Menge der Probe (bei einem flüssigen Produkt) bzw. einer Erstverdünnung (bei anderen Produkten) oder von Dezimalverdünnungen der Probe/Suspension überimpft;
- aerobes Bebrüten der Platten für 3 Tage bis 5 Tage bei $25\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$;
- Berechnen der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) von Hefen und Schimmelpilzen je Gramm oder je Milliliter Probe anhand der auf den Platten erhaltenen Anzahl der Kolonien, die bei Verdünnungsstufen gewählt werden, die zählbare Kolonien entstehen lassen. Schimmelpilze und Hefen werden gegebenenfalls separat gezählt.

ANMERKUNG Eine alternative Bedingung für die Bebrütung ist $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ für 5 Tage bis 7 Tage bei Verwendung des Nährmediums ohne Antibiotikum. Gegebenenfalls wird zur Unterscheidung der Hefekolonien von Bakterienkolonien die Identität zweifelhafter Kolonien durch Untersuchung mit einer Binokularlupe oder einem Mikroskop bestätigt.

5 Verdünnungsmittel und Nährmedien

5.1 Allgemeines

Die folgenden Verdünnungsmittel und Nährmedien sind für die Zählung von Hefen und Schimmelpilzen geeignet. Andere Verdünnungsmittel und Nährmedien dürfen verwendet werden, wenn sie sich für die Anwendung als geeignet erwiesen haben.

Verdünnungsmittel und Nährmedien dürfen anhand der in diesem Dokument enthaltenen Beschreibungen oder nach den Anweisungen des Herstellers aus wasserfreien Nährmedien hergestellt werden. Die Anweisungen des Lieferanten sollten befolgt werden.

ANMERKUNG Fertigmedien können verwendet werden, wenn deren Zusammensetzung und/oder deren Wachstums-
erträge mit denen der im vorliegenden Dokument angegebenen Zusammensetzungen vergleichbar sind.

5.2 Verdünnungsmittel

Die Rezeptur des Verdünnungsmittels für die Herstellung der Erstverdünnung und weiterer Dezimal-
verdünnungen ist in Anhang A angegeben.

5.3 Nährmedien

Die Liste und die Rezepte der möglichen Medien, die bei dem Plattierungsverfahren zur Beimpfung mit der
Erstverdünnung und den weiteren Dezimalverdünnungen verwendet werden dürfen, sind in Anhang B ange-
geben.

6 Geräte und Glasgeräte

Übliche Ausstattung, Geräte und Glasgeräte eines mikrobiologischen Labors verwenden. Eine detaillierte Liste
ist in prEN 17708:—¹ angegeben.

7 Handhabung von Pflanzen-Biostimulanzien und Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die tatsächlich repräsentativ ist und während des Transports
oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens: siehe prEN 17702-1².

Falls erforderlich, darf das zu prüfende Produkt vor Beginn der Analyse an die Raumtemperatur angeglichen
werden.

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

Zur Herstellung der Probe, der Erstverdünnung und für weitere Verdünnungen werden steriles Material, Geräte
und aseptische Arbeitstechniken verwendet. Bei der Herstellung der Erstverdünnung darf die Zeitspanne zwi-
schen dem Ende der Herstellung und dem Zeitpunkt, zu dem das Inokulum in Kontakt mit dem Nährmedium
kommt, 45 min nicht überschreiten, es sei denn, dies ist in den festgelegten Protokollen oder Dokumenten aus-
drücklich angegeben.

Bei den seriellen Probenverdünnungen sollten geeignete Negativkontrollen (nur Verdünnungsmittel) mitlau-
fen. Dies kann erfolgen, indem ein Aliquot des Verdünnungsmittels (d. h. 9 ml) unter den gleichen Bedingun-
gen wie bei der Prüfung bebrütet wird, um sich zu vergewissern, dass keine Trübungen vorhanden sind, und
somit die Sterilität des Verdünnungsmittels zu beurteilen. Oder alternativ kann 1 ml des Verdünnungsmittels
auf einer Oberfläche des gleichen Agarmediums, das für die Analyse verwendet wird, verteilt werden. Die Platte
wird unter den gleichen Bedingungen wie bei der Prüfung bebrütet, um sich zu vergewissern, dass kein Wachs-
tum vorliegt, und somit die Sterilität des Verdünnungsmittels zu beurteilen.

1 In Vorbereitung.

2 In Vorbereitung.

8.2 Prüfmenge und Erstverdünnung

8.2.1 Allgemeines

Eine repräsentative Probe des Produkts wird genommen, um die Erstverdünnung nach dem folgenden Verfahren herzustellen, das die verschiedenen Formulierungen von Produkten auf Basis von Biostimulanzen berücksichtigt:

8.2.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen

25 ml der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) (siehe Anhang A) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 10 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

8.2.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)

25 ml oder g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) (siehe Anhang A) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 10 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

8.2.4 Feststoff – als wasserdispergierbares Pulver (WP) formuliert

25 g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) (siehe Anhang A) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 20 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

8.2.5 Feststoff – als wasserdispergierbares Granulat (WDG) formuliert

25 g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) (siehe Anhang A) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 40 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist. Falls erforderlich, wird die Dispergierung der Formulierungen mit anderen Geräten, wie z. B. einem Stomacher, unterstützt, nachdem die Partikel abgesiebt (100-Mesh-Sieb) wurden, und anschließend werden die abgesiebten Partikel in derselben Suspension resuspendiert.

8.2.6 Feststoff – als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert

25 g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) (siehe Anhang A) gegeben, die in einem sterilen Beutel bei Raumtemperatur gehalten wird, und mit einem Stomacher höchstens 2 Minuten lang dispergiert; dies wird 3-mal im Abstand von 5 Minuten wiederholt, wobei der Beutel in Eiswasser gestellt wird.

8.2.7 Feststoff – Substrat

25 g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) (siehe Anhang A) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 20 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

8.3 Reihenverdünnungen

Aus der Erstverdünnung dürfen weitere Reihenverdünnungen (z. B. 1 : 10-Verdünnung) mit demselben Verdünnungsmittel (entsprechend dem erwarteten Grad der Kontamination des Produkts) vorgenommen werden. Die Verdünnungen werden gemischt, um eine Sedimentation von mikroorganismenhaltigen Partikeln zu vermeiden.

Allgemeine Regeln für die Herstellung von Dezimalverdünnungen sind in prEN 17708:—³ angegeben.

8.4 Plattenzählverfahren

8.4.1 Gussplattenverfahren

In Petrischalen von 85 mm bis 100 mm Durchmesser wird mit einer sterilen Pipette jeweils 1 ml der Erstverdünnung und/oder der Probenverdünnungen gegeben, und es werden 15 ml bis 20 ml von dem geschmolzenen, in einem Wasserbad bei nicht mehr als 48 °C aufbewahrten Agarmedium zugegossen.

Bei flüssigen Produkten ist es möglich, auch 1 ml unverdünntes Produkt zu beimpfen.

Probe und Medium werden durch vorsichtige drehende Bewegungen oder Neigen der Platten vermischt. Das Gemisch wird in den Petrischalen auf einer waagerechten Unterlage bei Raumtemperatur zum Erstarren gebracht.

Es wird empfohlen, die Zählung bei mindestens zwei Petrischalen durchzuführen.

8.4.2 Oberflächenausstrichverfahren (Spatelplattenverfahren/Ausstreichverfahren)

In Petrischalen von 85 mm bis 100 mm Durchmesser werden 15 ml bis 20 ml von dem geschmolzenen, in einem Wasserbad bei nicht mehr als 48 °C aufbewahrten Agarmedium gegeben.

Die Platten werden abgekühlt und zum Erstarren gebracht, z. B. in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank oder in einem Brutschrank. Über die Oberfläche des Mediums wird ein abgemessenes Volumen von mindestens 0,1 ml der Erstverdünnung und/oder der Probenverdünnungen mit einem sterilen Ausstreicher ausgestrichen, bis die Flüssigkeit vollständig in das Medium eingezogen ist.

Bei flüssigen Produkten ist es möglich, 0,1 ml unverdünntes Produkt zu beimpfen.

Um die Zählung kleiner Populationen von Hefen bzw. Schimmelpilzen zu erleichtern, können Volumina von bis zu 1 ml einer 10^{-1} -Verdünnung der Probe oder der Untersuchungsprobe, falls diese flüssig ist, auf drei Platten (Schalen von 85 mm bis 100 mm) oder über eine einzelne Platte von 140 mm verteilt werden.

Es wird empfohlen, die Zählung bei mindestens zwei Petrischalen durchzuführen.

8.4.3 Bebrütung

Die vorbereiteten Platten (8.3.1 oder 8.3.2) werden aerob, mit den Abdeckungen nach oben, in aufrechter Position im Brutschrank bei $(25 \pm 2,5)$ °C 3 Tage bis 5 Tage bebrütet, oder es wird die alternative Bedingung (4.2) angewendet. Die Agarplatten werden bei Bedarf 1 Tag bis 2 Tage in diffusem Tageslicht stehen gelassen.

Nach der Bebrütung müssen die Petrischalen, wenn möglich, sofort untersucht werden. Alternativ dürfen sie, sofern nicht anders festgelegt, für maximal bis zu 24 h bei (5 ± 3) °C im Kühlschrank gelagert werden.

ANMERKUNG 1 In bestimmten Fällen, wenn die Möglichkeit der Verwechslung von Partikeln aus dem Produkt mit ausgezählten Kolonien besteht, kann es sinnvoll sein, Petrischalen in doppelter Ausführung mit denselben Probenverdünnungen und demselben Agarmedium herzustellen, die zum Vergleich mit den bebrüteten Petrischalen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

ANMERKUNG 2 Wenn sowohl Hefen als auch Schimmelpilze vermutet werden oder wenn schnell wachsende Schimmelpilze vorhanden sind, kann eine Zwischenprüfung durchgeführt werden.

³ In Vorbereitung.

9 Zählung der Kolonien

Nach der Bebrütung werden die Kolonien in den Petrischalen mit 15 Kolonien bis 150 Kolonien gezählt, oder mit weniger als 15 Kolonien, wenn sie in den Platten des unverdünnten Produkts oder der Erstverdünnung gezählt werden.

ANMERKUNG 1 Zählverfahren für Hefen und insbesondere Schimmelpilze sind ungenau, da sie aus einer Mischung aus Myzel und ungeschlechtlichen und geschlechtlichen Sporen bestehen. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten hängt vom Grad der Fragmentierung des Myzels und vom Anteil der Sporen, die auf dem Plattenmedium wachsen können, ab.

ANMERKUNG 2 Eine Nichtlinearität der Zählungen von Verdünnungsausstrichen tritt häufig auf, d. h. eine 10-fache Verdünnung von Proben führt häufig nicht zu einer 10-fachen Verringerung der Anzahl der auf Plattenmedien gefundenen Kolonien. Dies wird auf die Fragmentierung von Myzelien und das Aufbrechen von Sporenklumpen während der Verdünnung, zusätzlich zu der kompetitiven Hemmung, wenn eine große Anzahl von Kolonien auf den Platten vorhanden ist, zurückgeführt.

VORSICHT — Die Sporen von Schimmelpilzen verbreiten sich sehr leicht in der Luft. Die Petrischalen sind vorsichtig zu behandeln, um die Entwicklung von Satellitenkolonien zu vermeiden, die zu einer Überschätzung der Population in der Probe führen würden.

Gegebenenfalls ist eine Untersuchung mit einer Binokularlupe oder mit einem Mikroskop durchzuführen, um Zellen von Hefen oder Schimmelpilzen und Bakterien aus Kolonien zu unterscheiden.

Die Hefekolonien und die Schimmelpilzkolonien sind gegebenenfalls getrennt zu zählen.

Zur Identifizierung von Hefen und Schimmelpilzen sind Bereiche mit Pilzwachstum auszuwählen und für eine genauere mikroskopische Untersuchung zu entnehmen oder auf geeignete Isolierungs- oder Identifikationsmedien zu beimpfen.

10 Angabe der Ergebnisse

10.1 Berechnungsverfahren

Die Anzahl N der in der Probe S vorhandenen Mikroorganismen wird berechnet mit

- m , dem arithmetischen Mittelwert der aus den zweifachen Ausführungen erhaltenen Keimzahlen (Koloniezahlen) [Gleichung (1)],
- c , der Anzahl der auf einer einzelnen Platte gezählten Kolonien [Gleichung (2)] oder
- dem gewichteten Mittelwert der aus zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen erhaltenen Keimzahlen [Gleichung (3)] nach den folgenden Gleichungen:

$$N = \frac{m}{V \cdot d} \quad (1)$$

$$N = \frac{c}{V \cdot d} \quad (2)$$

$$N = \frac{\sum c}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2) \cdot d} \quad (3)$$

Dabei ist

m der arithmetische Mittelwert der aus den zweifachen Ausführungen erhaltenen Keimzahlen;

V das auf jede Petrischale aufgebrauchte Volumen des Inokulums, in Milliliter;

- d die Verdünnung der Erstverdünnung (siehe 8.2) oder der ersten ausgezählten (weiteren) Verdünnung;
- c die Anzahl der auf einer einzelnen Platte gezählten Kolonien;
- $\sum c$ die Summe der auf allen Petrischalen gezählten Kolonien, erhalten von zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen;
- $n1$ die Anzahl der für die Erstverdünnung (oder für die erste ausgezählte Verdünnung) gezählten Petrischalen;
- $n2$ die Anzahl der für die 1 : 10-Verdünnung der Erstverdünnung (oder für die zweite ausgezählte Verdünnung) gezählten Petrischalen.

Das berechnete Ergebnis wird auf zwei signifikante Ziffern gerundet. Diesbezüglich wird, wenn die letzte Ziffer kleiner 5 ist, die vorausgehende Ziffer nicht verändert; ist die letzte Ziffer 5 oder größer, wird die vorausgehende Ziffer um eine Einheit erhöht. Es wird schrittweise vorgegangen, bis zwei signifikante Ziffern erhalten werden. Die erhaltene Anzahl N wird notiert.

Für nicht in diesem Dokument angeführte Fälle wird auf prEN 17714⁴ verwiesen.

10.2 Interpretation

10.2.1 Berücksichtigt werden sollte die inhärente Variabilität der Plattenzählung. Zwei Ergebnisse sollten nur dann als unterschiedlich betrachtet werden, wenn die Differenz 50 % überschreitet oder wenn die Differenz, angegeben im logarithmischen Maßstab, 0,3 log überschreitet.

Damit eine Zählung präzise ist, dürfen nur Platten mit mehr als 15 Kolonien und weniger als 150 Kolonien berücksichtigt werden.

BEISPIEL 1 Zwei Petrischalen für eine Verdünnung

$V = 1$; erhaltene Keimzahlen für die Verdünnung 10^{-1} : 38 und 42

Gleichung (1) $N = m/(V \cdot d) = 40/(1 \cdot 10^{-1}) = 400$ oder $4 \cdot 10^2$ Hefen und Schimmelpilze je Milliliter oder je Gramm der Probe.

BEISPIEL 2 Eine Petrischale für die unverdünnte flüssige Probe

$V = 1$; erhaltene Keimzahlen für die unverdünnte flüssige Probe: 12

Gleichung (2) $N = c/(V \cdot d) = 12/(1 \cdot 1) = 12$ oder $1,2 \cdot 10^1$ Hefen und Schimmelpilze je Milliliter der Probe.

BEISPIEL 3 Zwei Petrischalen für zwei Verdünnungen

$V = 1$; erhaltene Keimzahlen für die Verdünnung 10^{-2} : 128 und 132; für die Verdünnung 10^{-3} : 13 und 15

Gleichung (3) $N = \sum c/[V \cdot (n1 + 0,1n2) \cdot d] = (128 + 132 + 13 + 15)/(1 \cdot 2,2 \cdot 10^{-2}) = 13\,091$ oder $1,3 \cdot 10^4$ Hefen und Schimmelpilze je Milliliter oder je Gramm der Probe.

10.2.2 Wenn bei den Platten, die mit dem unverdünnten Produkt für die flüssige Probe beimpft wurden, oder bei den Platten, die mit der Erstverdünnung beimpft wurden, keine Kolonie beobachtet wird, wird das Ergebnis wie folgt angegeben:

— Es gibt weniger als $1/(d \cdot V)$ an Hefen und Schimmelpilzen je Milliliter oder je Gramm des Produkts.

4 In Vorbereitung.