

DIN EN 17713



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-06-07
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17713:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Bestimmung von Azospirillum spp.;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17713:2023**

Plant biostimulants –
Determination of Azospirillum spp.;
German and English version prEN 17713:2023

Biostimulants des végétaux –
Détermination d’Azospirillum spp.;
Version allemande et anglaise prEN 17713:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-04-07 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 48 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17713:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche 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.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2:2019 siehe DIN ISO 5725-2:2022-05

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 17713:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2:2022-05, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:2019); Text Deutsch und Englisch*

– *Entwurf* –

E DIN EN 17713:2023-05

– Leerseite –

April 2023

prEN 17713

Pflanzen-Biostimulanzien – Bestimmung von Azospirillum spp.

Plant biostimulants – Determination of Azospirillum spp.

Biostimulants des végétaux – Détermination d’Azospirillum spp.

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Zählung von <i>Azospirillum</i> spp.	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Probenvorbereitung	8
4.2.1 Allgemeines	8
4.2.2 Flüssigkeit — wasserbasierte Formulierungen	8
4.2.3 Flüssigkeit — als ölbasiertes emulgierbares Konzentrat (EC, en: emulsifiable concentrate) formuliert	8
4.2.4 Feststoff — als benetzbares Pulver (WP, en: wettable powder) formuliert	8
4.2.5 Feststoff — als wasserdispergierbares Granulat (WDG) formuliert	8
4.2.6 Feststoff — als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert	8
4.2.7 Feststoff — Substrat	8
4.3 Ausstattung (Geräte)	8
4.4 Reihenverdünnung	9
4.5 Herstellung der Nährmedien	9
4.6 Herstellung der Reihenverdünnung für die Zählung der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN, en: Most Probable Number)	9
4.7 Bebrütung von Röhrchen	9
4.8 Zählung	9
4.9 Verfahren zur Schätzung der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN)	10
5 Speziesbestimmung von <i>Azospirillum</i> spp. mittels Genanalyse	10
5.1 Allgemeines	10
5.2 Vorbereitung der Probe für die Extraktion der genomischen DNA	10
5.2.1 Isolierung und Aufbereitung der Mikroorganismen	10
5.2.2 Probenkonzentration	10
5.2.3 DNA-Extraktion und -lagerung	11
5.2.4 Partielle PCR-Amplifikation der 16S-rRNA-Gene	11
Anhang A (normativ) Formulierung der Nährmedien	13
A.1 0,1 M Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	13
A.2 Zusammensetzung des halbfesten Nfb-Mediums	13
A.2.1 Bestandteile	13
A.2.2 Verfahren zur Herstellung einer Spurenelementlösung	13
A.2.3 Verfahren zur Herstellung einer Vitaminlösung	14
A.2.4 Sterilisation und Vorbereitung von MPN-Röhrchen	14
A.3 Nähragar	14
A.4 Nährbouillon	14
Anhang B (normativ) Tabelle der MPN-Werte [9]	15
Anhang C (informativ) Wiederholpräzision und Vergleichpräzision	17
C.1 Allgemeines	17
C.2 Mikrobielle Analyse — Im Ringversuch verwendete Materialien	17
C.3 Mikrobielle Analyse — Ergebnisse des Ringversuchs	18
C.4 Genanalyse — Im Ringversuch verwendete Materialien	20
C.5 Genanalyse — 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	21
Literaturhinweise	22

Tabellen

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Pflanzen-Biostimulanzien	5
Tabelle B.1 — Wahrscheinlichste Keimzahlen zur Verwendung bei 10-fach-Verdünnung und 5 Röhrchen je Verdünnungsstufe [3] (P_1 ist die Anzahl der positiven Röhrchen bei der am wenigsten konzentrierten Verdünnung, bei der alle Röhrchen positiv sind oder bei der die größte Anzahl von Röhrchen positiv ist; P_2 und P_3 stellen die Anzahl der positiven Röhrchen bei den beiden nächsthöheren Verdünnungsstufen dar.)	15
Tabelle C.1 — Materialien, die im Ringversuch zur Bestimmung von <i>Azospirillum</i> sp. mittels mikrobieller Analyse in Proben von im Handel erhältlichen Biostimulanzienprodukten untersucht wurden	18
Tabelle C.2 — Ergebnisse des Ringversuchs zur Bestimmung von <i>Azospirillum</i> sp. mittels mikrobieller Analyse in Proben von im Handel erhältlichen Biostimulanzienprodukten .	19
Tabelle C.3 — Materialien, die im Ringversuch zur Bestimmung von <i>Azospirillum</i> sp. mittels Genanalyse in Proben von im Handel erhältlichen Biostimulanzienprodukten untersucht wurden	20
Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	21

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17713:2023) 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 17713:2022 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 Normungsauftrags 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 Pflanzen-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 Pflanzen-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 Pflanzen-Biostimulanzien in der Landwirtschaft, die auf lebenden Mikroorganismen der Gattung *Azospirillum* basieren, anwendbar.

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

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Pflanzen-Biostimulanzien

Erhöhung der Biodiversität
durch Verbesserung der Qualität/Quantität der Mikroorganismen im Boden.
Stärkung biologischer Regulationen und Wechselwirkungen
durch Verstärkung der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen:
— symbiotischer Austausch, d. h. <i>Mykorrhizae</i>
— symbiotischer Austausch, d. h. <i>Rhizobiaceae/Fabaceae</i>
— Sekrete, die Pflanzenhormone nachahmen (d. h. <i>Trichoderma</i>)
durch Regulierung pflanzenphysiologischer Prozesse:
— z. B. 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 Vorsichtsmaßnahmen 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 stellt die Methodik für die Zählung und Bestimmung von *Azospirillum* spp. in Pflanzen-Biostimulanzien in Übereinstimmung mit der Verordnung (EU) 2019/1009 des Europäischen Parlaments und des Rates [1] bereit.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

prEN 17702-1:—¹, *Pflanzen-Biostimulanzien — Probenahme und Probenvorbereitung — Teil 1: Probenahme*

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:

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

3.1

***Azospirillum* spp.**

gramnegative Bakterien, die zum Stamm der Alphaproteobacteria gehören

Anmerkung 1 zum Begriff: *Azospirillum* ist eine gramnegative, mikroaerophile, nonfermentative und stickstoff-fixierende Bakteriengattung. *Azospirillum* sind gramnegativ, bilden keine Sporen und haben eine leicht gewundene, längliche Stäbchenform. *Azospirillum* haben mindestens ein, teilweise auch mehrere Flagellen. Die Gattung weist ungefähr 20 Arten auf. Die Verwandtschaft zwischen diesen Arten wurde bisher nicht genau geklärt, es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass sie eine zusammengehörende Gruppe darstellen.

Anmerkung 2 zum Begriff: *Azospirillum* sind aerob, nonfermentativ, chemoorganotroph, vibroid, produzieren verschiedene Hormone, vornehmlich Auxine (bisher nicht bei allen Arten festgestellt), und die meisten sind diazotroph (sie fixieren und überführen Luftstickstoff in eine besser nutzbare Form).

[QUELLE: prEN 17724:—¹, 3.2.2.1]

4 Zählung von *Azospirillum* spp.

4.1 Allgemeines

Mit diesem Verfahren soll die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *Azospirillum* spp. je Gramm oder je Milliliter bestimmt werden. Damit dieses Verfahren schnell, günstig und wiederholbar ist, basiert es auf Reihenverdünnungen und Plattierung [6].

1 In Vorbereitung.

4.2 Probenvorbereitung

4.2.1 Allgemeines

Eine repräsentative Probe des zu analysierenden Produkts, die den Anforderungen der prEN 17702-1:—¹ entspricht, wird nach dem folgenden Verfahren hergestellt, das die verschiedenen Formulierungen von Produkten auf Basis von Pflanzen-Biostimulanzen berücksichtigt.

4.2.2 Flüssigkeit — wasserbasierte Formulierungen

25 ml der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 10 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist [7].

4.2.3 Flüssigkeit — als ölbasiertes emulgierbares Konzentrat (EC, en: emulsifiable concentrate) formuliert

25 ml der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 10 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist [7].

4.2.4 Feststoff — als benetzbares Pulver (WP, en: wettable powder) formuliert

25 g der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 20 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist [7].

4.2.5 Feststoff — als wasserdispergierbares Granulat (WDG) formuliert

25 g der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 275 g sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 40 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist. Falls erforderlich, wird die Dispergierung der Formulierungen mit anderen Geräten, wie z. B. einem Labor-Paddelmischer, unterstützt, nachdem die Partikel abgesiebt (100-Mesh-Sieb) wurden, und anschließend werden die abgesiebten Partikel in derselben Suspension resuspendiert [7].

4.2.6 Feststoff — als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert

25 g der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 225 g sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben, die in einem sterilen Beutel bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 40 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl dispergiert. Danach wird durch ein 100-Mesh-Sieb gesiebt; verbleibt Material im Sieb, wird der Vorgang bis zu höchstens dreimal wiederholt. Bei der exakten Endberechnung sind alle verwendeten Puffer zu berücksichtigen [7].

4.2.7 Feststoff — Substrat

25 g der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 225 g sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 20 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist [7].

4.3 Ausstattung (Geräte)

- Messpipetten (1 ml und 10 ml);
- Flaschen oder Kolben zur Herstellung von Verdünnungen;
- Petrischalen, durchsichtig, einheitlich, mit flachem Boden;

- Heißluftofen, der eine gleichmäßige und geeignete Temperatur erzeugen kann, ausgestattet mit einem Thermometer, das bis 250 °C kalibriert ist, und mit Lüftungsöffnungen, die so angeordnet sind, dass eine schnelle und gleichmäßige Erwärmung gewährleistet ist;
- Autoklav/Dampfsterilisator;
- Brutschrank;
- Handstückzähler oder mechanisches Zählgerät;
- pH-Messgerät.

4.4 Reihenverdünnung

Die Auszählung von Bakterien durch Verdünnung beruht auf dem Prinzip, Reihenverdünnungen vorzunehmen, um die Bakteriendichte so weit zu reduzieren, dass einzelne Zellen unterschieden werden können.

Als Verdünnungsmittel wird PBS (siehe Anhang A, Abschnitt A.1) verwendet.

4.5 Herstellung der Nährmedien

Die Herstellung und die Zusammensetzung des N-freien halbfesten Nfb-Mediums ist in Anhang A beschrieben.

Bei der Herstellung und Leistung eines Nährmediums handelt es sich um einen grundlegenden Schritt, um die Integrität der mikrobiologischen Untersuchung sicherzustellen.

Werden Fertigmedien verwendet, sollten die Hersteller dieser verfügbaren Medien über ein Qualitätsprogramm nach EN ISO 11133:2014² [6] verfügen, das die Qualität der von ihnen gelieferten Medien sicherstellt. Unter diesen Bedingungen braucht der Anwender/das Labor keine zusätzlichen Prüfungen an solchen Medien durchzuführen, er/es muss jedoch sicherstellen, dass die Lagerungsbedingungen den Empfehlungen der Hersteller entsprechen.

Bei Verdünnungsmitteln und Medien, die vom Anwender/Labor direkt aus handelsüblichen Trockenformulierungen und/oder aus einzelnen Grundkomponenten hergestellt werden, sollte die Leistung dieser Verdünnungsmittel/Medien nach EN ISO 11133:2014² [6] bewertet werden.

4.6 Herstellung der Reihenverdünnung für die Zählung der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN, en: Most Probable Number)

Die Probe wird wie in 4.3 beschrieben vorbereitet. Es werden Reihenverdünnungen bis zu einer 10^{-8} -Verdünnung hergestellt. Mit der Pipette werden 1-ml-Aliquote der 10^{-4} - bis 10^{-8} -Verdünnung entnommen und in Kulturröhrchen mit Schraubverschluss oder Reagenzgläser, die N-freie halbfeste Nfb-Medien enthalten, gegeben. Es sind 5 Parallelproben erforderlich.

4.7 Bebrütung von Röhrchen

Die Röhrchen werden beschriftet und 3 Tage bis 4 Tage bei (36 ± 1) °C aufrechtstehend in einem Reagenzglasständer bebrütet. Das Medium darf während des gesamten Bebrütungszeitraums keine Störung erfahren.

4.8 Zählung

Die Röhrchen, bei denen ein Farbumschlag zu Blau eingetreten ist und die typische weiße Pellikel unter der Oberfläche entwickelt haben, werden gezählt.

2 Geändert durch EN ISO 11133:2014/A1:2018 und EN ISO 11133:2014/A2:2020.

Die Röhrchen werden als + (positiv) oder – (negativ) gezählt, je nachdem, ob Pellikel unter der Oberfläche vorhanden sind oder nicht, und für die Berechnung berücksichtigt.

4.9 Verfahren zur Schätzung der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN)

Um die wahrscheinlichste Anzahl von Organismen in der ursprünglichen Probe zu berechnen, wird als P_1 die Anzahl der positiven Röhrchen bei der am wenigsten konzentrierten Verdünnung, bei der alle Röhrchen positiv sind oder bei der die größte Anzahl von Röhrchen + ist, gewählt; P_2 und P_3 stellen die Anzahl der positiven Röhrchen bei den beiden nächsthöheren Verdünnungsstufen dar.

Anschließend wird die Zahlenreihe in Anhang B, Tabelle B.1, gesucht, in der P_1 und P_2 den experimentell ermittelten Werten entsprechen. Dieser Zahlenreihe wird in der Tabelle bis zu der Spalte gefolgt, die mit dem ermittelten Wert von P überschrieben ist.

Die Zahl im Schnittpunkt ist die wahrscheinlichste Anzahl von Organismen in der Menge der ursprünglichen Probe, die in dem in der zweiten Verdünnung zugegebenen Inokulum vorliegt. Diese Zahl wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert, um den MPN-Wert zu erhalten.

$$\text{Azospirillum – Anzahl je g des Trägers} = \frac{\text{Wert aus MPN-Tabelle} \times \text{Verdünnungsstufe}}{\text{Trockenmasse des Produkts (g)}}$$

5 Speziesbestimmung von *Azospirillum* spp. mittels Genanalyse

5.1 Allgemeines

Dieses Verfahren zielt darauf ab, **die Gattung und letztendlich die Spezies der *Azospirillum* spp.** mittels amplifizierter ribosomaler DNA-Restriktionsanalyse (ARDRA, en: Amplified rDNA Restriction Analysis) der 16s-rRNA-Gene zu bestimmen (1).

5.2 Vorbereitung der Probe für die Extraktion der genomischen DNA

5.2.1 Isolierung und Aufbereitung der Mikroorganismen

- 1 g des Produkts wird in 100 ml sterile physiologische Kochsalzlösung gegeben.
- Die Suspension wird 5 min lang unter sterilen Bedingungen in Bewegung gehalten.
- Die Suspension wird unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse in einer mit Nähragar vorbereiteten Petrischale ausgestrichen, um wenige Einzelkolonien voneinander zu isolieren.
- Die Platte wird 48 h bis 72 h bei 28 °C bebrütet.
- Es wird auf eine einzelne typische Kolonie (konvex, mit Rändern, Farbe) geprüft.
- Unter sterilen Bedingungen wird der Inhalt einer Impföse von der typischen isolierten Kolonie entnommen, in einen 100-ml-Kolben mit Nährbouillon gegeben und 48 h lang bei 130 min^{-1} und 28 °C in Bewegung gehalten.

5.2.2 Probenkonzentration

- 0,5-ml-Aliquote der Bouillon werden entnommen und in 1,0 ml sterile Kochsalzlösung in einem 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen gegeben; anschließend wird 10 min lang bei $13\,000 \text{ min}^{-1}$ zentrifugiert.
- Der Überstand sollte vorsichtig abgegossen werden, sodass die Zellpellets zurückbleiben.
- Die Zellpellets sollten fünfmal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden, um das schleimige Exopolysaccharid (EPS) zu entfernen.

5.2.3 DNA-Extraktion und -lagerung

- Molekularbiologische Kits/Chemikalien. Die Bakterien-DNA kann mit Kits zur Extraktion mikrobieller DNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers extrahiert werden. Beispiel: innuPREP Bacteria DNA Kit (Analytik Jena)³.
- Die PCR-Reaktionen können mit jeder üblichen Polymerase entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt werden. Beispiel: MTP™ Taq DNA Polymerase³ (Merck).
- Die Aufreinigung des PCR-Produkts kann mit jedem üblichen Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt werden.
- Anschließend kann es bei –20 °C gelagert werden.

5.2.4 Partielle PCR-Amplifikation der 16S-rRNA-Gene

5.2.4.1 PCR-Amplifikation

- Die PCR-Amplifikation sollte als 30-µl-Reaktion mit 23,55 µl sterilem PCR-Wasser, 3,0 µl Puffer (Biolabs), 0,6 µl dNTP (10 mM), je 0,3 µl Y1- und Y3-Primer (10 mM), 0,6 µl 5 % Tween 20,³ 0,15 µl Taq-DNA-Polymerase (Biolabs) und 1,5 µl DNA-Template durchgeführt werden.
- Die Sequenzen der für die PCR-Amplifikation des 16S-rRNA-Gens verwendeten Primer sind: Y1-Vorwärts-Primer (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'), der den Positionen 20 bis 43 entspricht, und Y3-Rückwärts-Primer (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3'), der den Positionen 1 482 bis 1 507 bei der 16S-rDNA-Sequenz von Escherichia coli entspricht.
- Es sollte eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt werden.
- Die DNA sollte in einem Thermocycler (Beispiel: Techgene Thermal Cycler³— Techne) amplifiziert werden, der wie folgt programmiert ist: initiale DNA-Denaturierung 2 min bei 94 °C; 35 Zyklen (Denaturierung 45 s bei 94 °C, Annealing 45 s bei 62 °C und Elongation 2 min bei 72 °C).
- Die finale Elongation sollte 5 min bei 72 °C durchgeführt werden.

5.2.4.2 Visualisierung der PCR-Produkte

- Amplifizierte PCR-Produkte sollten durch Gelelektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel sichtbar gemacht werden.
- Zur Färbung kann zum Beispiel Ethidiumbromid, GelRed, Acridinorange oder SYBR Green (Biolabs) verwendet werden.

5.2.4.3 Sequenzierung partieller 16S-rRNA-Gene

- Die PCR-Produkte werden anschließend zur Sanger-Sequenzierung an ein darauf spezialisiertes Labor geschickt.
- Das Isolat kann dann durch Nukleotidsequenzanalyse des PCR-Produkts und anschließenden Vergleich dieser Sequenz mit bekannten, in einer Datenbank gespeicherten Sequenzen, z. B. durch BLAST-Analyse

3 innuPREP Bacteria DNA Kit, MTP™ Taq DNA Polymerase, Tween 20 und Techgene Thermal Cycler sind Beispiele für geeignete Produkte, die im Handel erhältlich sind. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.