

DIN EN 17714



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-06-07
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17714:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Bestimmung der Konzentration von Mikroorganismen;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17714:2023**

Plant biostimulants –
Determination of microorganisms' concentration;
German and English version prEN 17714:2023

Biostimulants des végétaux –
Détermination de la concentration en microorganismes;
Version allemande et anglaise prEN 17714:2023

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 45 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17714:2023) 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 17714:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Veröffentlichungsform von einer Technischen Spezifikation zu einer Europäischen Norm;
- b) der informative Anhang ZA zum Zusammenhang mit der Verordnung für EU-Düngeprodukte wurde ergänzt.

April 2023

prEN 17714

Pflanzen-Biostimulanzien – Bestimmung der Konzentration von Mikroorganismen

Plant biostimulants – Determination of microorganisms' concentration

Biostimulants des végétaux – Détermination de la concentration en microorganismes

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung des Verfahrens	7
5 Probenahme	7
6 Herstellung einer Probe für die mikrobielle Analyse	7
7 Verfahren zur Zählung von Mikroorganismen	8
7.1 Allgemeines	8
7.2 Keimzählung unter Einsatz eines festen Mediums	8
7.2.1 Allgemeines	8
7.2.2 Anzahl der Petrischalen je Verdünnung	8
7.2.3 Plattengussverfahren	8
7.2.4 Oberflächenbeimpfung	9
7.2.5 Bebrütung	10
7.2.6 Berechnung und Angabe der auf festen Medien erhaltenen Ergebnisse	10
7.3 Keimzählung und Quantifizierung unter Einsatz eines flüssigen Mediums	17
7.3.1 Kurzbeschreibung	17
7.3.2 Beimpfung	17
7.3.3 Wahl des Beimpfungssystems	17
8 Angabe der Ergebnisse	19
9 Untersuchungsbericht	19
10 Qualitätssicherung	19
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	20
Literaturhinweise	21

Tabellen

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien	4
Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	20

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17714:2023) 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 17714:2022 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 Komponentenmaterialkategorie 7 des Anhangs II der EU-Düngeprodukteverordnung angegeben.

Dieses Dokument ist für alle Biostimulanzien in der Landwirtschaft anwendbar.

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

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien

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:
— z. B. für Wachstum, Stoffwechsel, Pflanzenentwicklung ...
Verbesserung der biogeochemischen Kreisläufe
— Verbesserung der Aufnahme von Nährstoffelementen
— Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffelementen im Boden
— Stimulierung des Abbaus organischer Substanz

Dieses Dokument legt die allgemeinen Regeln zur Bestimmung der Konzentration von Mikroorganismen in Proben von Pflanzen-Biostimulanzien fest.

Die spezifischen Konzentrationen der Mikroorganismen, die bei spezifischen Standardverfahren erforderlich sind, haben gegenüber den in diesem Dokument aufgeführten allgemeinen Regeln Vorrang.

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 legt allgemeine Regeln für die Bestimmung der Konzentration von Mikroorganismen in Pflanzen-Biostimulanzien fest.

Das Verfahren ist auf mikrobielle Pflanzen-Biostimulanzien anwendbar, und zwar, um zu verifizieren, dass die Konzentration von Mikroorganismen die entsprechenden Grenzwerte der EU-Düngeprodukteverordnung [1] nicht überschreitet.

Dieses horizontale Verfahren ist für bestimmte Produkte nicht unbedingt bis ins Detail geeignet. In diesem Fall ist es notwendig, auf die Methodik der spezifischen Bestimmung und Quantifizierung der Mikroorganismen zurückzugreifen.

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 17708:—¹, *Pflanzen-Biostimulanzien — Probenvorbereitung für die mikrobielle Analyse*

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

Pflanzen-Biostimulansprodukt

Produkt zur Stimulation von pflanzlichen Ernährungsprozessen unabhängig vom Nährstoffgehalt des Produktes, wobei ausschließlich auf die Verbesserung der Nährstoffverwertungseffizienz, der Toleranz gegenüber abiotischem Stress, der Qualitätsmerkmale der Pflanze oder der Rhizosphäre der Pflanze oder der Verfügbarkeit von im Boden oder in der Rhizosphäre enthaltenen Nährstoffen abgezielt wird

3.2

Mikroorganismus

jede mikrobiologische Einheit, einschließlich niederer Pilze, Bakterien und Viren, zellulär und nicht zellulär, mit der Fähigkeit, genetisches Material, einschließlich toter Mikroorganismen oder Leerzellen-Mikroorganismen sowie unschädlicher Elemente der Medien, auf denen sie erzeugt wurden, zu replizieren oder zu übertragen

[QUELLE: EN 17724:—¹, 3.2.2 [3]]

¹ In Vorbereitung.

3.3

Kolonie

lokalisierte sichtbare Anhäufung mikrobiologischer Masse (wie Prokaryoten, Bakterien, Mikromyceten, Hefen und Pilze) oder Organismen (wie *Dreissena*-Arten), die sich auf oder in einem festen Nährmedium aus einem lebensfähigen Partikel oder Organismus entwickelt haben

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

Prüfmateri al

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

3.5

Laborprobe

im Zusammenhang mit chemischen und physikalischen Prüfungen, Endprobe, die für die Untersuchung im Laboratorium vorgesehen ist, und, im Zusammenhang mit mikrobiologischen Prüfungen, jede einzelne Segmentprobe, die für die Untersuchung im Laboratorium vorgesehen ist

3.6

Erstverdünnung

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

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Das Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Mikroorganismen wurde erarbeitet, um ein allgemeines Verfahren zur Zählung von Mikroorganismen in Pflanzen-Biostimulansprodukten bereitzustellen. Die Ergebnisse werden als Anzahl der aktiven Einheiten je Volumen oder Gewicht oder in einer anderen für den Mikroorganismus zutreffenden Weise ausgedrückt, beispielsweise als koloniebildende Einheiten (KBE) je Gramm oder bei Mykorrhizae als UPM (Einheit zur Zählung von Mykorrhizae, en: unit potential mycorrhizal).

5 Probenahme

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens (siehe prEN 17702-1:—). Liegt keine spezifische Internationale oder Europäische Norm vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

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

6 Herstellung einer Probe für die mikrobielle Analyse

Die Untersuchungsprobe wird aus der Laborprobe nach prEN 17708:—¹ hergestellt. Liegt keine spezifische Internationale oder Europäische Norm vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

7 Verfahren zur Zählung von Mikroorganismen

7.1 Allgemeines

Bei der Beurteilung der mikrobiologischen Qualität von Pflanzen-Biostimulanzien reicht es oft nicht aus, nur zu wissen, welche Mikroorganismen vorliegen. In den meisten Fällen ist der quantitative Aspekt ebenso wichtig, woraus sich das Erfordernis der Auszählung der Mikroorganismen ergibt. Diese darf auf verschiedene Weise durchgeführt werden: durch direkte Untersuchung (Mikroskopie), durch Beimpfung von festen oder von flüssigen Medien. In diesem Dokument wird jedoch nur die Zählung unter Einsatz von festen und flüssigen Medien behandelt.

Die Keimzahlzählung unter Einsatz von festen Medien basiert auf der Fähigkeit vieler Mikroorganismen, in oder auf Agarmedien Kolonien zu bilden, die mit dem bloßen Auge oder einem einfachen Vergrößerungsglas erkennbar sind.

Wenn zu erwarten ist, dass die Bakterienzahl sehr gering ist (weniger als 10 Kolonien in oder auf einer Platte bei der niedrigsten Verdünnung), wird zur Verbesserung der statistischen Sicherheit der Ergebnisse die Keimzählung unter Einsatz von flüssigen Medien (z. B. MPN) empfohlen.

7.2 Keimzählung unter Einsatz eines festen Mediums

7.2.1 Allgemeines

Die verschiedenen Schritte für die Zählung unter Einsatz eines festen Mediums (Anzahl der Petrischalen/Verdünnung, Plattengussverfahren, Oberflächenbeimpfung, Bebrütung) werden in den verschiedenen nachstehenden Abschnitten und/oder in der spezifischen Norm für den Nachweis/die Bestimmung von Mikroorganismen beschrieben.

Die Petrischalen sollten mit der Probennummer, der Verdünnung, dem Datum und allen anderen gewünschten Informationen beschriftet werden.

Die Verdünnungen sollten so gewählt sein, dass sichergestellt ist, dass Platten mit einer angemessenen Anzahl von Kolonien erhalten werden (siehe 7.2.6.1) und dass mögliche inhibitorische Eigenschaften überwunden werden.

Für das Überführen aus jeder Verdünnung wird eine gesonderte sterile Pipette verwendet, es sei denn, es wird aus der höchsten in die niedrigste Verdünnung überführt.

7.2.2 Anzahl der Petrischalen je Verdünnung

Für Zählverfahren bei Pflanzen-Biostimulansprodukten muss eine Platte je Verdünnung, bei mindestens zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen, angelegt werden. Zur Verbesserung der Zuverlässigkeit dürfen auch zwei Platten je Verdünnungsstufe angelegt werden.

Wenn nur eine Verdünnungsstufe verwendet wird, müssen zur Verbesserung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse zwei Platten mit dieser Verdünnung angelegt werden.

Laboratorien, die nicht nach Qualitätssicherungsgrundsätzen arbeiten, müssen zur Verbesserung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse zwei Platten je Verdünnung anlegen.

7.2.3 Plattengussverfahren

Die festgelegten Volumina der zu untersuchenden Verdünnung werden entnommen, wobei mit der Spitze der Pipette die Seitenwand des Röhrchens berührt wird, um außen anhaftende, überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Der Deckel der sterilen Petrischale wird gerade hoch genug angehoben, um die Pipette einzuführen; dann wird der Inhalt abgegeben.

Nach der Entnahme des temperierten Agarmediums aus dem Wasserbad wird die Flasche mit einem sauberen Tuch trockengetupft, um eine Kontamination der Platten mit Wasser zu verhindern. Beim Ausgießen des Mediums ist ein Verschütten auf die Außenseite des Behälters oder auf die Innenseite des Deckels der Petrischale zu vermeiden. Um eine Kontamination der Medien zu vermeiden, ist die Flasche nahezu waagrecht zu halten.

Außerdem ist es zu vermeiden, die Flasche zwischen den Eingießvorgängen abzusetzen. In jede Petrischale wird innerhalb von 15 min nach dem Beimpfen geschmolzenes Agarmedium mit einer Temperatur von 44 °C bis 47 °C gegossen (im Allgemeinen 18 ml bis 20 ml Agar bei Petrischalen von 90 mm Durchmesser und 45 ml bis 50 ml bei Petrischalen von 140 mm Durchmesser, um eine Schichtdicke von mindestens 3 mm zu erhalten) (um eine Aggregation von Kolonien zu vermeiden). Dabei ist ein direktes Aufgießen des geschmolzenen Agars auf das Inokulum zu vermeiden. Das geschmolzene Medium und das Inokulum werden sofort vorsichtig vermischt, um eine homogene Verteilung der Mikroorganismen im Medium zu erreichen, z. B. durch behutsames Bewegen der Schale vor und zurück, hin und her und kreisförmig. Zum Abkühlen und Erstarrenlassen werden die Petrischalen auf eine kühle waagerechte Fläche gestellt (die Erstarrungszeit des Agars darf 10 min nicht überschreiten).

7.2.4 Oberflächenbeimpfung

7.2.4.1 Allgemeines

Ausplattierungsverfahren, die darauf ausgelegt sind, nur Oberflächenkolonien auf Agarplatten zu erzeugen, haben gewisse Vorteile. Die Morphologie der Oberflächenkolonien lässt sich leicht erkennen, sodass der Untersuchende besser zwischen verschiedenen Kolonietypen unterscheiden kann.

Es sind vorgegossene Platten mit mindestens 3 mm Dicke des Agarmediums zu verwenden, die eben und frei von Luftblasen und Oberflächenfeuchtigkeit sind.

Um ein gleichmäßiges Verteilen zu erleichtern, sollte die Oberfläche des erstarrten Agars nach EN ISO 11133:2014² [6] oder wie in der entsprechenden Internationalen Norm angegeben getrocknet werden, damit das Inokulum innerhalb von 15 min absorbiert wird.

7.2.4.2 Ausstreichspatelverfahren

Mit einer sterilen Pipette wird das Inokulum (in der Regel 0,1 ml oder 0,5 ml) der flüssigen Untersuchungsprobe bzw. der Erstverdünnung bei anderen Proben auf die Agarplatte (90 mm bzw. 140 mm Durchmesser) übertragen. Dieser Schritt wird für die nächste Dezimalverdünnung (die zu zählenden Kolonien liegen dann bei flüssigem Probenmaterial in einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} und bei sonstigem Probenmaterial in einer Verdünnungsstufe von 10^{-2} vor) und ggf. für weitere Dezimalverdünnungen wiederholt.

Die Auszählgrenze kann um den Faktor 10 herabgesetzt werden, indem 1,0 ml der Untersuchungsprobe, wenn es sich um eine Flüssigkeit handelt, oder 1,0 ml der Erstverdünnung bei anderen Produkten entweder auf die Oberfläche einer großen Agarplatte (140 mm) oder auf die Oberfläche von drei kleinen Agarplatten (90 mm) abgeimpft wird. In beiden Fällen sind Doppelproben vorzubereiten, wenn nur eine Verdünnung verwendet wird, und zwar indem zwei große Platten oder sechs kleine Platten verwendet werden.

Das Inokulum wird mit einem Spatel aus Glas, Kunststoff oder Stahl (z. B. hergestellt aus einem Glasstab und geformt wie ein Hockeyschläger mit einem Durchmesser von ungefähr 3,5 mm und einer Länge von 20 cm, der ungefähr 3 cm von einem Ende entfernt rechtwinklig abgebogen und an den Enden durch Erhitzen abgeflacht ist) so schnell wie möglich gleichmäßig über der Agaroberfläche verteilt, ohne die Seitenwände der Petrischale zu berühren. Zur Aufnahme des Inokulums werden die Schalen mit aufgesetzten Deckeln ungefähr 15 min auf Raumtemperatur gehalten.

In bestimmten Fällen (wie in der entsprechenden Internationalen Norm angegeben) darf das Inokulum auf eine Membran aufgebracht und dann wie zuvor beschrieben ausgestrichen werden.

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

7.2.5 Bebrütung

Sofern in den spezifischen Normen nicht anders angegeben, werden die Schalen nach dem Beimpfen umgedreht und zügig kopfüber in den auf die entsprechende Temperatur eingestellten Brutschrank gestellt. Falls eine übermäßige Austrocknung auftritt (z. B. bei 55 °C oder bei starker Luftzirkulation), werden die Schalen vor der Bebrütung locker in Kunststoffbeutel eingewickelt oder es wird ein ähnliches System mit gleichwertiger Effizienz verwendet.

Während der Bebrütungsdauer können geringfügige Schwankungen der Bebrütungstemperatur unvermeidbar und annehmbar sein, z. B. bei den üblichen Arbeitsgängen des Beschickens oder Entladens des Brutschranks; es ist jedoch wichtig, diese Zeiträume so kurz wie möglich zu halten. Die Dauer dieser Schwankungen sollte überwacht werden um sicherzustellen, dass sie keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis haben.

Manchmal kann es für den Laborbetrieb sinnvoll sein, beimpfte Schalen vor der Bebrütung nicht länger als 24 h zu kühlen. Ist das der Fall, muss das Labor sicherstellen, dass diese Praxis keine Auswirkungen auf die resultierenden Keimzahlen hat.

Im Allgemeinen sollten bei aerober Bebrütung nicht mehr als sechs Petrischalen übereinandergestapelt werden, und die Stapel sollten einen Abstand von mindestens 25 mm zueinander und zu den Wänden des Brutschranks haben. Höhere Stapel mit weniger Abstand können jedoch in Brutschränken mit Umluftsystemen annehmbar sein; in diesem Fall sollte die Temperaturverteilung überprüft werden. Nach der Bebrütung sollten die Petrischalen üblicherweise sofort untersucht werden. Sie dürfen jedoch, sofern in spezifischen Normen nicht anders festgelegt, für bis zu 48 h im Kühlschrank gelagert werden. Eine gekühlte Lagerung ist nur dann annehmbar, wenn sie nachweislich keinen Einfluss auf die Anzahl, das Aussehen oder die nachfolgende Bestätigung der Kolonien hat. Bei bestimmten Medien, die Indikatorfarbstoffe enthalten, sollten sich gekühlte Platten vor der Untersuchung bei Raumtemperatur akklimatisieren, um sicherzustellen, dass sich die richtige Farbe wieder einstellt.

7.2.6 Berechnung und Angabe der auf festen Medien erhaltenen Ergebnisse

7.2.6.1 Zählung der Kolonien

Nach der in der spezifischen Norm angegebenen Bebrütungsdauer werden die Kolonien (Gesamtkoloniezahl, typische Kolonien oder mutmaßlich verdächtige Kolonien) für jede Schale, die bis zu einschließlich 300 Kolonien (oder eine andere in der spezifischen Norm angegebene Zahl) aufweist, gezählt.

Die in diesem Unterabschnitt behandelten Fälle entsprechen den folgenden allgemeinen Vorgaben:

- Beimpfung einer Petrischale mit einem Durchmesser von 90 mm je Verdünnung, wobei mindestens zwei aufeinanderfolgende Verdünnungen durchgeführt werden;
- höchste zählbare Anzahl der insgesamt vorhandenen Kolonien: 300 je Schale;
- höchste Gesamtzahl der auf einer Schale vorhandenen (typischen und atypischen) Kolonien beim Auszählen typischer oder präsumtiver Kolonien: vorzugsweise 300 je Schale;
- höchste zählbare Anzahl für typische oder präsumtive Kolonien: 150 je Schale;
- Anzahl der präsumtiven Kolonien in jeder Schale, die zur Identifizierung oder Bestätigung abgeimpft werden: im Allgemeinen 5.

Diese Zahlenwerte müssen in den spezifischen Normen festgelegt sein.

Die im Folgenden festgelegten Berechnungsverfahren gelten für die Fälle, die bei der Durchführung von Untersuchungen nach guter Laborpraxis am häufigsten auftreten. Da gelegentlich Sonderfälle auftreten können (z. B. kann die Anzahl der Kolonien in zwei Schalen mit der gleichen Verdünnung eine erhebliche Diskrepanz aufweisen oder das Verhältnis der für zwei aufeinanderfolgende Verdünnungen verwendeten Verdünnungsfakto-

ren sehr unterschiedlich sein), ist es erforderlich, dass die erhaltenen Zählergebnisse von einem qualifizierten Mikrobiologen geprüft und interpretiert und gegebenenfalls verworfen werden.

7.2.6.2 Berechnungsverfahren: allgemeiner Fall (Zählung der Gesamtkolonien oder der typischen Kolonien)

Für ein gültiges Ergebnis wird es im Allgemeinen als notwendig erachtet, die Kolonien auf mindestens einer Schale zu zählen, die mindestens 10 Kolonien (Gesamtkoloniezahl, typische Kolonien oder die Identifizierungs- oder Bestätigungskriterien erfüllende Kolonien [siehe 7.2.6.3]) enthält.

Die Anzahl N der in der Untersuchungsprobe vorliegenden Mikroorganismen wird als gewichtetes Mittel aus zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen nach Gleichung (1) berechnet:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad (1)$$

Dabei ist

$\sum C$ die Summe der auf den beiden Schalen gezählten Kolonien, erhalten von zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen, von denen mindestens eine mindestens 10 Kolonien enthält;

V das in jede Petrischale eingebrachte Volumen des Inokulums, in Milliliter;

d die Verdünnung, die der ausgewerteten ersten Verdünnungsstufe entspricht ($d = 1$, wenn das unverdünnte flüssige Produkt [Untersuchungsprobe] ausgewertet wird).

Wird mehr als eine Verdünnung verwendet, wird erwartet, dass das Verhältnis zwischen der Koloniezahl der Verdünnungsstufe d_2 und der Koloniezahl der Verdünnungsstufe d_1 10 % beträgt. Vom Labor sollten für die Koloniezahl der Verdünnungsstufe d_2 der obere und der untere Grenzwert ausgewiesen werden.

BEISPIEL Wenn die Koloniezahl der Verdünnung d_1 250 beträgt, sollte die Koloniezahl der Verdünnung d_2 nicht weniger als 13 (5,2 %) und nicht mehr als 39 (15,6 %) betragen.

Das berechnete Ergebnis wird auf zwei signifikante Ziffern gerundet. Dabei wird, wenn die dritte Ziffer kleiner als 5 ist, die vorausgehende Ziffer nicht verändert; ist die dritte Ziffer größer als oder gleich 5, wird die vorausgehende Ziffer um eine Einheit erhöht.

Das Ergebnis wird vorzugsweise als Zahl zwischen 1,0 und 9,9, multipliziert mit der entsprechenden Potenz von 10, oder als ganze Zahl mit zwei signifikanten Ziffern angegeben.

Das Ergebnis wird als Anzahl N der Mikroorganismen je Milliliter (bei flüssigen Produkten) oder je Gramm (bei anderen Produkten) angegeben.

7.2.6.3 Berechnungsverfahren: Fall nach Identifizierung oder Bestätigung

7.2.6.3.1 Allgemeines

Wenn bei dem verwendeten Verfahren eine Identifizierung oder Bestätigung gefordert ist, wird aus jeder der für die Koloniezählung erhaltenen Schalen eine festgelegte Anzahl A (im Allgemeinen 5) präsumtiver Kolonien identifiziert. Nach der Identifizierung oder Bestätigung wird für jede der Schalen die Anzahl a der Kolonien, die die Identifizierungs- oder Bestätigungskriterien erfüllen, nach Gleichung (2) berechnet:

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad (2)$$

Dabei ist

b die Anzahl der Kolonien, die unter den identifizierten Kolonien *A* die Identifizierungs- oder Bestätigungskriterien erfüllen;

C die Gesamtzahl der präsumtiven Kolonien, die auf der Schale gezählt werden.

Das berechnete Ergebnis wird auf die nächstliegende ganze Zahl gerundet. Dabei wird, wenn die Ziffer der ersten Nachkommastelle kleiner als 5 ist, die vorausgehende Ziffer nicht verändert; ist die Ziffer der ersten Nachkommastelle größer oder gleich 5, wird die vorausgehende Ziffer um eine Einheit erhöht.

Die Anzahl *N*, *N_E* oder *N'* der in der Untersuchungsprobe vorhandenen identifizierten oder bestätigten Mikroorganismen wird berechnet, indem in den in 7.2.6.2 angegebenen Gleichungen $\sum C$ durch $\sum a$ ersetzt wird oder indem in den in 7.2.6.4.1 und 7.2.6.5.3 angegebenen Gleichungen *C* durch *a* ersetzt wird. Das berechnete Ergebnis wird wie in 7.2.6.2 angegeben gerundet.

Das Ergebnis wird wie in 7.2.6.2, 7.2.6.4.1 bzw. 7.2.6.5.3 angegeben ausgedrückt.

7.2.6.3.2 Beispiel

Die Auszählung hat folgende Ergebnisse erbracht:

- bei der ausgewerteten ersten Verdünnungsstufe (10^{-3}): 66 Kolonien;
- bei der ausgewerteten zweiten Verdünnungsstufe (10^{-4}): 4 Kolonien.

Die Prüfung ausgewählter Kolonien wurde durchgeführt:

- von den 66 Kolonien wurden 8 Kolonien untersucht, von denen 6 die Kriterien erfüllten, daher ist *a* = 50;
- von den 4 Kolonien erfüllten alle 4 die Kriterien; daher ist *a* = 4.

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times d} = \frac{50 + 4}{1 \times 1,1 \times 10^{-3}} = \frac{54}{1,1 \times 10^{-3}} = 49\,090$$

Durch Runden des Ergebnisses, wie in 7.2.6.2 festgelegt, ergibt sich die Anzahl der Mikroorganismen als 49 000 oder $4,9 \times 10^4$ je Milliliter oder je Gramm des Produkts.

7.2.6.4 Berechnungsverfahren: geschätzte Keimzahlen

7.2.6.4.1 Fall von zwei Schalen (Untersuchungsprobe oder Erstverdünnung oder erste Verdünnungsstufe), die weniger als 10 Kolonien enthalten

Hinsichtlich der unteren Bestimmungsgrenze gelten die Anforderungen und Empfehlungen entsprechend 7.2.6.2.

Wenn jede der beiden mit der Untersuchungsprobe (bei flüssigen Produkten) oder der Erstverdünnung (bei anderen Produkten) oder mit der ersten Verdünnungsstufe beimpften oder erhaltenen Schalen weniger als 10 Kolonien (Gesamtkoloniezahl, typische Kolonien oder die Identifizierungs- oder Bestätigungskriterien erfüllende Kolonien) enthält und beide Schalen mindestens 4 Kolonien enthalten, wird die geschätzte Anzahl *N_E* der in der Untersuchungsprobe vorliegenden Mikroorganismen als arithmetischer Mittelwert der auf den beiden Schalen gezählten Kolonien nach Gleichung (3) berechnet:

$$N = \frac{\sum C}{V_{nd}} \quad (3)$$