

DIN EN 17716



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-07-05
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17716:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Bestimmung von Escherichia coli;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17716:2023**

Plant biostimulants –
Determination of Escherichia coli;
German and English version prEN 17716:2023

Biostimulants des végétaux –
Détermination de Escherichia coli;
Version allemande et anglaise prEN 17716:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-05-05 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 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17716:2023) 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 17716:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

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

April 2023

prEN 17716

Pflanzen-Biostimulanzien – Bestimmung von Escherichia coli

Plant biostimulants – Determination of Escherichia coli

Biostimulants des végétaux – Détermination de Escherichia coli

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
4.1 Qualitatives Verfahren	8
4.2 Quantitatives Verfahren	8
5 Verdünnungslösung und Nährmedium	8
5.1 Allgemeines	8
5.2 Bouillon und Nährmedien beim qualitativen Verfahren	9
5.2.1 Anreicherungsbouillon	9
5.2.2 Selektive Nährmedien: Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX) zur Isolierung von <i>Escherichia coli</i>	9
5.3 Verdünnungslösung und Nährmedien beim quantitativen Verfahren	9
5.3.1 Verdünnungslösung	9
5.3.2 Nährmedien: Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX)	9
6 Geräte und Glasgeräte	9
7 Handhabung von Pflanzen-Biostimulanzien und Probenahme	9
8 Durchführung	9
8.1 Allgemeines	9
8.2 Qualitatives Verfahren	10
8.2.1 Allgemeines	10
8.2.2 Feste Formulierungen: Formulierung mit wasserdispergierbarem Pulver (WP, en: wetable powder), wasserdispergierbarem Granulat (WDG, en: water dispersible granules), Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung)	10
8.2.3 Flüssige Formulierungen: wasserbasierte Formulierungen und ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)	10
8.2.4 Bebrütung der beimpften Anreicherungsbouillon	10
8.2.5 Nachweis und Identifizierung von <i>Escherichia coli</i>	10
8.3 Quantitatives Verfahren	11
8.3.1 Prüfmenge und Erstverdünnung	11
8.3.2 Verdünnungsreihen	12
8.3.3 Beimpfung (Ausstrichverfahren) und Bebrütung	12
8.3.4 Zählen der koloniebildenden Einheiten	12
9 Angabe der Ergebnisse	13
9.1 Angabe der Ergebnisse in der qualitativen Prüfung	13
9.2 Angabe der Ergebnisse in der quantitativen Prüfung	13
10 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Anreicherungsbouillon beim qualitativen Verfahren	15
A.1 Allgemeines	15
A.2 Anreicherungsbouillon	15
A.2.1 Eugon-LT-100-Bouillon	15
A.3 Andere Anreicherungsbouillon	16
A.3.1 Allgemeines	16
A.3.2 Flüssiges Laktosemedium	16
Anhang B (informativ) Selektiver Agar im qualitativen und quantitativen Verfahren	17
B.1 Allgemeines	17
B.2 Selektiver Agar zur Isolierung	17
B.2.1 Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX)	17
B.3 Anderer selektiver Agar zur Isolierung	18

B.3.1	MacConkey-Agar	18
B.4	Selektiver Agar zur Bestätigung	18
B.4.1	Levine-Eosin-Methylenblau-Agar (EMB-Agar)	18
Anhang C	(informativ) Verdünnungslösung beim quantitativen Verfahren	20
C.1	Allgemeines	20
C.2	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	20
C.2.1	Zusammensetzung	20
C.2.2	Herstellung	20
Anhang D	(informativ) Neutralisierung der antimikrobiellen Merkmale des Produkts	21
D.1	Allgemeines	21
D.2	Eignung des Nachweisverfahrens	21
D.3	Interpretation der Ergebnisse von Eignungsprüfungen	22
Anhang E	(informativ) Ringversuch	23
E.1	Im Ringversuch verwendete Materialien	23
E.2	Ergebnisse des Ringversuchs	24
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	25
Literaturhinweise		26

Tabellen

Tabelle 1	— Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien [1]	5
Tabelle 2	— Morphologische Merkmale von <i>Escherichia coli</i> auf Trypton-Galle-Glucuronid-Agar	10
Tabelle B.1	— Morphologie der Kolonien auf MacConkey-Agar	18
Tabelle B.2	— Morphologie der Kolonien auf EMB-Agar	19
Tabelle E.1	— Im Ringversuch untersuchte Probenarten	23
Tabelle E.2	— Codes für Proben und hinzugefügte lyophilisierte Fläschchen, die mit dem Titer jedes Fläschchens geprüft wurden	23
Tabelle E.3	— Ergebnisse	24
Tabelle ZA.1	— Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17716:2023) 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 17716:2022 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]

Steigerung der Biodiversität
durch Verbesserung der Qualität/Quantität der Mikroorganismen im Boden.
Verstärkung der biologischen Regulierung und Wechselwirkungen
durch Verstärkung der Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Mikroorganismus:
— 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. für Wachstum, Stoffwechsel, Pflanzenentwicklung usw.
Verbesserung der biogeochemischen Kreisläufe
— Verbesserung der Aufnahme von Nährstoffelementen
— Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffelementen im Boden
— Anregung 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 enthält allgemeine Leitlinien für den Nachweis und die Identifizierung des festgelegten Mikroorganismus *Escherichia coli* in technischen und formulierten Produkten von Biostimulanzien (sowohl in flüssigem als auch in festem Zustand) sowie das horizontale Verfahren für die Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* in Produkten von Pflanzen-Biostimulanzien (sowohl in flüssigem als auch in festem Zustand).

Das in diesem Dokument beschriebene qualitative Verfahren basiert auf dem Nachweis von *Escherichia coli* in einem nicht-selektiven flüssigen Medium (Anreicherungsbouillon), gefolgt von der Isolierung auf einem selektiven Agar. Je nach gewünschtem Nachweisgrad können auch andere Methoden geeignet sein.

ANMERKUNG Für den Nachweis von *Escherichia coli* können Subkulturen auf nicht-selektiven Nährmedien durchgeführt werden, gefolgt von geeigneten Identifizierungsschritten (z. B. unter Verwendung von Identifizierungskits).

Das in diesem Dokument beschriebene quantitative Verfahren verwendet ein Koloniezählverfahren bei 44 °C auf einem festen Medium, das einen chromogenen Bestandteil zum Nachweis des Enzyms β -Glucuronidase enthält.

WARNUNG — Stämme von *Escherichia coli*, die bei 44 °C nicht wachsen, und insbesondere solche, die β -Glucuronidase-negativ sind, wie z. B. *Escherichia coli* O157, werden nicht erkannt.

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).

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

EN ISO 21148:2017, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Allgemeine Anleitungen zur mikrobiologischen Untersuchung (ISO 21148:2017)*

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

Escherichia coli

gramnegatives Stäbchen, beweglich, glatte Kolonien, Familie der *Enterobacteriaceae*

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Hauptmerkmale zur Identifizierung sind Katalase-positiv, Oxidase-negativ, Fermentation von Laktose, Produktion von Indol, Wachstum auf Selektivmedium mit Gallensalzen mit charakteristischen Kolonien.

Anmerkung 2 zum Begriff: *Escherichia coli* kann aus feuchten Umweltquellen (Luft, Wasser, Boden) isoliert werden und ist ein Indikator für fäkale Verunreinigungen.

1 In Vorbereitung.

3.2

Anreicherungsbouillon

nicht-selektives, flüssiges, geeignetes Neutralisationsmittel und/oder Dispersionsmittel enthaltendes Medium und nachweislich für das zu prüfende Produkt geeignet

3.3

β -Glucuronidase-positive *Escherichia coli*

Bakterien, die bei 44 °C auf Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX) unter den im entsprechenden Teil dieses Dokuments angegebenen Bedingungen typische blaue Kolonien bilden

3.4

Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli*

Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) der β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* je Milliliter oder je Gramm Probe, wenn die Prüfung und Berechnungen mit dem entsprechenden Teil dieses Dokuments durchgeführt werden

4 Kurzbeschreibung

4.1 Qualitatives Verfahren

Der erste Schritt des qualitativen Verfahrens besteht darin, ohne das Risiko einer Hemmung durch die selektiven Inhaltsstoffe, die in selektiven/Differentialnährmedien vorhanden sind, zur Erhöhung der Anzahl der Mikroorganismen eine Anreicherung unter Verwendung eines nicht-selektiven Bouillon-Mediums durchzuführen.

Der zweite Schritt der Prüfung (Isolierung) wird auf einem selektiven Medium durchgeführt, gefolgt von Identifizierungsprüfungen.

Die Anwesenheit oder Abwesenheit von *Escherichia coli* je Gramm oder je Milliliter der Probe wird berechnet (siehe Abschnitt 9).

4.2 Quantitatives Verfahren

Beim quantitativen Verfahren werden zwei Platten aus Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX) mit der festgelegten Menge der Untersuchungsprobe (wenn das Produkt flüssig ist) oder der Erstverdünnung (wenn das Produkt fest ist) beimpft.

Unter denselben Bedingungen werden unter Verwendung der Dezimalverdünnungen der Untersuchungsprobe oder der Erstverdünnung zwei Platten je Verdünnungsstufe beimpft.

Die Schalen werden 18 h bis 24 h bei (44 ± 1) °C bebrütet und dann auf die Anwesenheit von Kolonien untersucht, die aufgrund ihrer Merkmale als β -Glucuronidase-positive *Escherichia coli* gelten.

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* je Gramm oder je Milliliter Probe wird berechnet (siehe Abschnitt 9).

5 Verdünnungslösung und Nährmedium

5.1 Allgemeines

Die folgenden Verdünnungslösungen und Nährmedien sind für den Nachweis von *Escherichia coli* und die Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* nach dem korrekten Verfahren geeignet. Andere Verdünnungslösungen und Nährmedien dürfen verwendet werden, wenn sie sich als geeignet erwiesen haben.

Verdünnungslösungen und Nährmedien dürfen anhand der mitgelieferten Beschreibungen oder aus Reagenzien/Trockennährmedien nach den Anweisungen des Herstellers hergestellt werden. Die Anweisungen des

Lieferanten der Medien/Reagenzien sollten in Bezug auf Lagerbedingungen, Verfallsdatum und Verwendung befolgt werden.

ANMERKUNG Gebrauchsfertige Verdünnungslösungen und Medien können verwendet werden, wenn ihre Zusammensetzung und/oder Wachstumsausbeuten mit denen der im vorliegenden Dokument angegebenen Rezepturen vergleichbar sind.

5.2 Bouillon und Nährmedien beim qualitativen Verfahren

5.2.1 Anreicherungsbouillon

Die Anreicherungsbouillon wird beim qualitativen Verfahren verwendet, um die Probe zu dispergieren und die mikrobielle Erstpopulation zu erhöhen. In Anhang A sind die nicht abschließende Liste und die Rezepturen der möglichen Anreicherungsbouillon aufgeführt.

5.2.2 Selektive Nährmedien: Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX) zur Isolierung von *Escherichia coli*

Der selektive Agar wird beim qualitativen Verfahren zur Isolierung und zur Identifizierung von *Escherichia coli* verwendet. Anhang B enthält eine Liste und Rezepturen des selektiven Agars.

5.3 Verdünnungslösung und Nährmedien beim quantitativen Verfahren

5.3.1 Verdünnungslösung

Anhang C enthält eine Liste und Rezepturen von Verdünnungslösungen, die zur Herstellung der Erstverdünnung und weiterer Dezimalverdünnungen verwendet werden.

5.3.2 Nährmedien: Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX)

Anhang B enthält eine Liste und Rezepturen des Nährmediums, das bei der Beimpfung durch Ausstreichen der Erstverdünnung und der weiteren Dezimalverdünnungen verwendet wird.

6 Geräte und Glasgeräte

Die für das mikrobiologische Labor typischen Laborausrüstungen, Geräte und Glasgeräte nach EN 17708:—¹ müssen verwendet werden.

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 nicht Teil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens: EN 17702-1² muss verwendet werden.

Falls erforderlich, darf das zu prüfende Produkt vor Beginn der Analyse auf Raumtemperatur gebracht werden.

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

Je nach Ziel der Analyse darf eines der nachfolgend beschriebenen Verfahren durchgeführt werden.

² In Vorbereitung.

Mit dem qualitativen Verfahren (siehe 8.2) kann die Anwesenheit oder Abwesenheit von *Escherichia coli* in mindestens 1 g oder 1 ml des zu prüfenden Produkts bewertet werden.

Mit dem quantitativen Verfahren (siehe 8.3) kann die Anzahl der β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* in Form von KBE je g oder je ml des zu prüfenden Produkts bestimmt werden.

8.2 Qualitatives Verfahren

8.2.1 Allgemeines

25 g oder 25 ml der Probe werden in 225 ml sterile Anreicherungsbouillon gegeben. Dabei wird *S*, das genaue Gewicht oder Volumen der Probe, beachtet.

8.2.2 Feste Formulierungen: Formulierung mit wasserdispergierbarem Pulver (WP, en: wettable powder), wasserdispergierbarem Granulat (WDG, en: water dispersible granules), Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung)

Die Erstverdünnung (siehe 8.2.1) wird in einem Stomacher für 2 min bei höchster Drehzahl durchmischt. Kurz darauf werden 10 ml dieser Suspension bebrütet (siehe 8.2.4).

8.2.3 Flüssige Formulierungen: wasserbasierte Formulierungen und ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)

10 ml der gut gemischten Erstverdünnung (siehe 8.2.1) werden entnommen und bebrütet (siehe 8.2.4).

8.2.4 Bebrütung der beimpften Anreicherungsbouillon

Die in der Bouillon vorbereitete Erstverdünnung (siehe 8.2.2 zu festen Formulierungen oder 8.2.3 zu flüssigen Formulierungen) wird bei $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ für mindestens 20 h (maximal 72 h) bebrütet.

8.2.5 Nachweis und Identifizierung von *Escherichia coli*

8.2.5.1 Isolierung

Mit einer sterilen Schlaufe wird ein Aliquot der bebrüteten Anreicherungsbouillon (8.2.4) auf die Oberfläche des Trypton-Galle-Glucuronid-Agars gestrichen, um voneinander getrennte Kolonien zu erhalten.

Die Petrischale wird umgedreht und dann bei $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 18 h bis 24 h bebrütet. Die Gesamtbebrütungszeit darf nicht länger als 24 h sein. Es wird auf charakteristische Kolonien geprüft (siehe Tabelle 2).

WARNUNG — Wenn der Verdacht besteht, dass gestresste Zellen vorhanden sind, wird zunächst für 4 h bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet und dann die Bebrütungstemperatur für 18 h bis 24 h auf $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ erhöht. Die Bebrütungstemperatur darf 45°C nicht überschreiten.

Tabelle 2 — Morphologische Merkmale von *Escherichia coli* auf Trypton-Galle-Glucuronid-Agar

Selektives Medium	Charakteristische Morphologie von <i>Escherichia coli</i> -Kolonien
Trypton-Galle-Glucuronid-Agar	blau bis blau-grün

8.2.5.2 Identifizierung von *Escherichia coli*

8.2.5.2.1 Allgemeines

Bei Zweifeln an den morphologischen Merkmalen der gewachsenen Kolonien werden die folgenden Prüfungen für diese verdächtigen Kolonien durchgeführt, die auf dem selektiven Agar isoliert wurden. Die Anwesenheit von *Escherichia coli* darf durch andere geeignete Kultur- und biochemische Prüfungen bestätigt werden.

8.2.5.2.2 Gram-Färbung

Die Prüfung wird nach EN ISO 21148:2017 durchgeführt. Es wird auf gramnegative Stäbchen (Bazillen) geprüft.

8.2.5.2.3 Kultur auf Levine-Eosin-Methylen-Blau-Agar (EMB-Agar)

Die Oberfläche des Levine-Eosin-Methylen-Blau-Agars (Rezepturen siehe Anhang B) mit verdächtigen isolierten Kolonien, die auf TBX-Agar gewachsen sind, wird so beimpft, dass sich isolierte Kolonien entwickeln. Die Petrischale wird umgedreht und anschließend bei $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ für mindestens 24 h (maximal 48 h) bebrütet.

Es wird auf charakteristische Kolonien geprüft (siehe Anhang B).

8.3 Quantitatives Verfahren

8.3.1 Prüfmenge und Erstverdünnung

8.3.1.1 Allgemeines

Eine repräsentative Probe des Produkts wird entnommen, um die Erstverdünnung nach folgendem Verfahren herzustellen, das die verschiedenen Formulierungen von Produkten auf Basis von Biostimulanzien berücksichtigt.

8.3.1.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen

25 ml der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS, en: phosphate buffer solution) gegeben (siehe Anhang C), die bei Raumtemperatur in einem Kolben aufbewahrt wird, und für mindestens 10 min mit einem Magnetrührer bei halber Drehzahl geschüttelt, bis die Verteilung optimal ist.

8.3.1.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)

25 ml oder g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS, en: phosphate buffer solution) gegeben (siehe Anhang C), die bei Raumtemperatur in einem Kolben aufbewahrt wird, und für mindestens 10 min mit einem Magnetrührer bei halber Drehzahl geschüttelt, bis die Verteilung optimal ist.

8.3.1.4 Feststoff – als wasserdispergierbares Pulver (WP, en: wettable powder) formuliert

25 g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben (siehe Anhang C), die bei Raumtemperatur in einem Kolben aufbewahrt wird, und für mindestens 20 min mit einem Magnetrührer bei halber Drehzahl geschüttelt, bis die Verteilung optimal ist.

8.3.1.5 Feststoff – als wasserdispergierbares Granulat (WDG) formuliert

25 g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben (siehe Anhang C), die bei Raumtemperatur in einem Kolben aufbewahrt wird, und für mindestens 40 min mit einem Magnetrührer bei halber Drehzahl geschüttelt, 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.

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

25 g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) (siehe Anhang C) gegeben, die bei Raumtemperatur in einem sterilen Beutel aufbewahrt wird, und mit einem Stomacher für maximal 2 min dispergiert. Dieser Vorgang wird dann 3-mal mit einem Abstand von 5 min wiederholt, während der Beutel in Wasser mit Eis gelegt wird.

8.3.1.7 Feststoff – Substrat

25 g der Probe werden in 225 ml sterile Phosphatpufferlösung (PBS) gegeben (siehe Anhang C), die bei Raumtemperatur in einem Kolben aufbewahrt wird, und für mindestens 20 min mit einem Magnetrührer bei halber Drehzahl geschüttelt, bis die Verteilung optimal ist.

8.3.2 Verdünnungsreihen

Zusätzliche Verdünnungsreihen (z. B. 1 : 10-Verdünnung) dürfen aus der Erstverdünnung unter Verwendung derselben Verdünnungslösung durchgeführt werden (entsprechend dem erwarteten Verunreinigungsgrad des Produkts). Die Verdünnungen werden durchmischt, um eine Sedimentation von mikroorganismenhaltigen Partikeln zu vermeiden.

Allgemeine Regeln bei der Herstellung der Dezimalverdünnungen siehe EN 17708:—¹.

8.3.3 Beimpfung (Ausstrichverfahren) und Bebrütung

8.3.3.1 Mit einer Mikropipette wird ein abgemessenes Volumen von nicht weniger als 0,1 ml der Erstverdünnung und/oder Probenverdünnungen auf die Oberfläche des Mediums übertragen und auf ihr verteilt, bis die Flüssigkeit vollständig in das Medium eingezogen ist.

Bei flüssigen Produkten ist es zulässig, 0,1 ml des unverdünnten Produkts zu beimpfen.

Der Vorgang wird mit den weiteren Dezimalverdünnungen wiederholt, um ggf. mindestens zwei aufeinanderfolgende Verdünnungen zu haben.

Um die Zählung geringer Populationen zu erleichtern, können Volumina von bis zu 1 ml einer 10⁻¹-Verdünnung der Probe oder der Untersuchungsprobe, falls diese flüssig ist, auf bis zu drei Platten (Schalen mit einem Durchmesser von 85 mm bis 100 mm) oder auf eine einzelne Platte von 140 mm verteilt werden.

Es wird empfohlen, die Zählung (vorzugsweise) mit mindestens zwei Petrischalen durchzuführen, aber es ist zulässig, nur eine Petrischale zu verwenden, wenn es sich um Routineprüfungen handelt oder wenn Zählungen an aufeinanderfolgenden Verdünnungen derselben Probe oder nach früheren Ergebnissen oder als Bestätigung früherer Ergebnisse für dieselbe Probe durchgeführt werden.

8.3.3.2 Die beimpften Schalen werden umgedreht, sodass der Boden oben liegt, und für 18 h bis 24 h in einen auf 44 °C eingestellten Brutschrank gestellt. Die Gesamtbebrütungszeit darf nicht länger als 24 h sein.

WARNUNG — Wenn der Verdacht besteht, dass gestresste Zellen vorhanden sind, wird zunächst für 4 h bei 37 °C bebrütet und dann die Bebrütungstemperatur für 18 h bis 24 h auf (44 ± 1) °C erhöht.

8.3.4 Zählen der koloniebildenden Einheiten

Nach der festgelegten Bebrütungszeit werden die typischen KBE von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* in jeder Schale gezählt, die weniger als 150 typische KBE und weniger als 300 gesamte (typische und nicht-typische) KBE enthält.

Wenn sie Teil der zurückbehaltenen Schalen sind, sollten die Schalen, die 0 typische KBE enthalten, in den verschiedenen Berechnungsverfahren, die in EN 17714³ festgelegt sind, berücksichtigt werden.

³ In Vorbereitung.

9 Angabe der Ergebnisse

9.1 Angabe der Ergebnisse in der qualitativen Prüfung

Wenn die Identifizierung der Kolonien die Anwesenheit dieser Spezies bestätigt, wird das Ergebnis folgendermaßen angegeben:

„Anwesenheit von *Escherichia coli* in der Probe S.“

Wenn kein Wachstum nach der Anreicherung beobachtet wird und/oder wenn die Identifizierung der Kolonien die Anwesenheit dieser Spezies nicht bestätigt, wird das Ergebnis folgendermaßen angegeben:

„Abwesenheit von *Escherichia coli* in der Probe S.“

9.2 Angabe der Ergebnisse in der quantitativen Prüfung

Die Anzahl, N , der in der Probe, S , vorhandenen β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* wird mit

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

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

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

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

Dabei ist

- m der arithmetische Mittelwert der aus den Doppelproben erhaltenen Zählungen;
- V das Volumen des Inokulums, das auf jede Schale aufgetragen wird, in Milliliter;
- d die Verdünnung der Erstverdünnung (siehe 8.3.1) oder für die erste gezählte Verdünnung;
- c die Anzahl der auf einer einzelnen Platte gezählten Kolonien;
- $\sum c$ die Summe der Kolonien, die auf allen Schalen gezählt wurden, die von zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen zurückbehalten wurden;
- n_1 die Anzahl der für die Erstverdünnung (oder für die erste gezählte Verdünnung) gezählten Schalen;
- n_2 die Anzahl der Schalen, die für die 1:10-Verdünnung der Erstverdünnung (oder für die zweite gezählte Verdünnung) gezählt wurden.

Gleichung (1) ist in den Fällen anwendbar, in denen nur eine Platte je Verdünnung beimpft wird; Gleichung (2) ist in den Fällen anwendbar, in denen 2 Platten je Verdünnung beimpft werden.

Das berechnete Ergebnis wird auf zwei signifikante Ziffern gerundet. Dabei wird, wenn die letzte Ziffer unter 5 liegt, die vorhergehende Ziffer nicht verändert; wenn die letzte Ziffer 5 oder mehr beträgt, wird die vorherge-

hende Ziffer um eine Einheit erhöht. Es wird schrittweise vorgegangen, bis zwei signifikante Ziffern erhalten werden. Die erhaltene Zahl, N , wird notiert.

Eine detaillierte Erläuterung (niedrige Zählungen oder Zählungen nach Bestätigung) der quantitativen Ergebnisse als KBE von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* je g oder je ml des Produkts findet sich in EN 17714³.

10 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

- a) sämtliche zur vollständigen Identifizierung der Pflanzen-Biostimulanzien notwendigen Angaben;
- b) falls bekannt, das angewendete Probenahmeverfahren;
- c) das angewendete Prüfverfahren (qualitativ oder quantitativ) mit Verweisung auf dieses Dokument (EN 17716);
- d) alle Einzelheiten der Arbeitsgänge für die Herstellung der Erstverdünnung und die nächsten Verdünnungen, falls hergestellt, je nach Verfahren;
- e) die Beschreibung der verwendeten Verdünnungslösung und des verwendeten Mediums;
- f) das (die) erzielte(n) Ergebnis(se) unter genauer Angabe des verwendeten Angabeverfahrens in Verbindung mit dem angewendeten Prüfverfahren (qualitativ oder quantitativ), d. h. die Ergebnisse dürfen beim qualitativen Verfahren als Anwesenheit oder Abwesenheit und beim quantitativen Verfahren als KBE/g oder KBE/ml angegeben werden; und
- g) wenn die Wiederholpräzision geprüft wurde, das erzielte Endergebnis.