

DIN EN 17718



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-06-21
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17718:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Bestimmung von Rhizobium spp.;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17718:2023**

Plant biostimulants –
Determination of Rhizobium spp.;
German and English version prEN 17718:2023

Biostimulants des végétaux –
Détermination de Rhizobium spp.;
Version allemande et anglaise prEN 17718:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-04-21 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 17718:2023) 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.

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 17718:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Veröffentlichungsform von einer Technischen Spezifikation zu einer Europäischen Norm;
- b) Ergänzung des Abschnitts 4.4 Herstellung des Nährmediums;
- c) Ergänzung des informativen Anhangs B mit Ringversuchsdaten zur Wiederhol- und Vergleichpräzision des Verfahrens;
- d) 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 17718:2023-05

– Leerseite –

Pflanzen-Biostimulanzien – Bestimmung von Rhizobium spp.

Plant biostimulants – Determination of Rhizobium spp.

Biostimulants des végétaux – Détermination de Rhizobium spp.

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Zählung von <i>Rhizobium</i> spp., <i>Mesorhizobium</i> spp., <i>Ensifer</i> spp. oder <i>Bradyrhizobium</i> spp.	8
4.1 Allgemeines	8
4.2 Probenvorbereitung	8
4.2.1 Allgemeines	8
4.2.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen	8
4.2.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)	8
4.2.4 Feststoff – als wasserdispergierbares 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	9
4.2.7 Feststoff – Substrat	9
4.3 Reihenverdünnung	9
4.4 Herstellung der Nährmedien	9
4.5 Plattenzählungen von Rhizobia in sterilem Verdünnungsmittel	10
4.6 Auszählen von Ausstrichplatten	10
4.7 Wachstumsmedien	11
4.8 Berechnung	11
5 Speziesbestimmung von <i>Rhizobium</i> spp., <i>Mesorhizobium</i> spp., <i>Ensifer</i> spp., <i>Bradyrhizobium</i> spp. mittels genetischer Analyse	11
5.1 Allgemeines	11
5.2 Vorbereitung der Probe für die Extraktion der genomischen DNA	12
5.2.1 Isolierung und Aufbereitung der Mikroorganismen	12
5.2.2 Probenkonzentration	12
5.2.3 DNA-Extraktion und -lagerung	12
5.2.4 Partielle PCR-Amplifikation der 16S-rRNA-Gene	12
Anhang A (informativ) Formulierungen von Nährmedien	14
A.1 YT-Medien (Trypton-Hefeextrakt-Medien) für <i>Rhizobium</i> spp., <i>Mesorhizobium</i> spp. und <i>Ensifer</i> spp.	14
A.1.1 Inhaltsstoffe von YT-Medien (und vorgeschlagene Lieferanten)	14
A.1.2 Verfahren zur Herstellung von YT-Medien	14
A.2 Alternative AYEM-Medien (Mannit-Agar mit modifiziertem Hefeextrakt) für <i>Rhizobium</i> spp.	14
A.2.1 Inhaltsstoffe von AYEM-Medien (und vorgeschlagene Lieferanten)	14
A.2.2 Verfahren zur Herstellung von AYEM-Medien	15
A.3 R2A-Agar (Reasoner's 2A-Agar) für <i>Bradyrhizobium</i> spp.	15
A.3.1 Inhaltsstoffe von R2A-Medien (und vorgeschlagene Lieferanten)	15
A.3.2 Verfahren zur Herstellung von YT-Medien	15
A.4 Kongorot-Stammlösung für AYEM-Medien	16
A.4.1 Inhaltsstoff der Kongorot-Stammlösung	16
A.5 0,1 M Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	16
A.6 Nährbouillon	16
Anhang B (informativ) Wiederholpräzision und Vergleichpräzision des Verfahrens	17
B.1 Im Ringversuch verwendete Materialien	17
B.2 Ergebnisse des Ringversuchs	17
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
-----------------------------	----

Bilder

Bild 1 — Schema von Reihenverdünnungen	10
--	----

Tabellen

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Pflanzen-Biostimulanzien	5
Tabelle 2 — Anforderungen an Medien und Bebrütung	11
Tabelle A.1 — Inhaltsstoffe von YT-Medien (und vorgeschlagene Lieferanten)	14
Tabelle A.2 — Inhaltsstoffe von AYEM-Medien (und vorgeschlagene Lieferanten)	14
Tabelle A.3 — Inhaltsstoffe von R2A-Medien (und vorgeschlagene Lieferanten)	15
Tabelle A.4 — Inhaltsstoff von YT-Medien	16
Tabelle B.1 — Materialien, die im Ringversuch zur Zählung und Bestimmung von <i>Rhizobium</i> sp., <i>Mesorhizobium</i> sp., <i>Ensifer</i> sp. oder <i>Bradyrhizobium</i> sp. in Pflanzen-Biostimulanzienprodukten untersucht wurden	17
Tabelle B.2 — Ergebnisse des Ringversuchs zur Zählung und Bestimmung von <i>Rhizobium</i> sp., <i>Mesorhizobium</i> sp., <i>Ensifer</i> sp. oder <i>Bradyrhizobium</i> sp. in Pflanzen-Biostimulanzienprodukten	18
Tabelle B.3 — Proben, die für den Ringversuch zur Zählung und Bestimmung von <i>Rhizobium</i> sp., <i>Mesorhizobium</i> sp., <i>Ensifer</i> sp. oder <i>Bradyrhizobium</i> sp. in Pflanzen-Biostimulanzienprodukten ausgegeben wurden	18
Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	20

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17718:2023) 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 17718:2022 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 SRM/564 und M/564/Amd1, ist auch ein Beitrag zur Strategie „Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy 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 Gruppe der Rhizobia 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 Regulations- und Wechselwirkungsmechanismen
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 usw.
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 wurde entwickelt, um die Methodik für die Zählung und Bestimmung von *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Ensifer* sp. oder *Bradyrhizobium* sp. in Pflanzen-Biostimulanzienprodukten in Übereinstimmung mit der Verordnung (EU) 2019/1009 des Europäischen Parlaments und des Rates [1] bereitzustellen.

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

EN 17724:—², *Pflanzen-Biostimulanzien — Terminologie*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 17724:—² und 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

Rhizobium

nützliche Bakterien aus der Gruppe der Rhizobia, von denen die relevantesten Gattungen *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* und *Bradyrhizobium* sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Die zu dieser Gruppe gehörenden Rhizobien sind *Rhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Ensifer* spp., *Bradyrhizobium* spp.

Anmerkung 2 zum Begriff: Hülsenfrüchtler (Leguminosae oder Fabaceae) gelten mit 14 % der gesamten weltweiten Anbaufläche als die zweithäufigst angebaute Pflanzenart und stellen sowohl durch den direkten Verzehr als auch indirekt als Futtermittel eine wichtige Nahrungsquelle für den Menschen dar. Leguminosen können dank einer speziellen Symbiose, die sie mit bestimmten im Boden vorhandenen Mikroorganismen, die in der Rhizosphäre Luftstickstoff fixieren können, eingehen, hochwertige, proteinreiche Lebensmittel und Futtermittel liefern. Diese Mikroorganismen sind für 65 % des gesamten fixierten Stickstoffs verantwortlich. Diese Mikroorganismen wurden ursprünglich *Rhizobium* genannt. Das Wort ‚*Rhizobium*‘ geht zurück auf die beiden griechischen Wörter ‚*rhizo*‘ für Wurzel und ‚*bium*‘ für Heim. Seit dem späten 19. Jahrhundert wurden alle Knöllchenbakterien von Leguminosen der Gattung ‚*Rhizobium*‘ zugeordnet. Nach und nach wurde erkannt, dass diese jedoch sehr vielfältig sind. Einige langsam wachsende Rhizobien wurden zu der neuen Gattung ‚*Bradyrhizobium*‘ zusammengefasst. In der 1984er Ausgabe von Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology wurden alle Rhizobia der Familie Rhizobiaceae zugeordnet, welche *Bradyrhizobium* und *Rhizobium* umfasst. Seitdem ist die Zahl der zu den Rhizobia gehörenden Bakteriengattungen rasch angestiegen. Rhizobia sind auf den Wurzelknöllchen einer Pflanze lebende, assoziativ symbiotische, stickstofffixierende Bakterien. Heutzutage beruht die Klassifizierung der verschiedenen Rhizobiaarten auf der 16S-rDNA-Sequenzierung und physiologischen und biochemischen Eigenschaften. In Erwägung, dass Taxonomie und Phylogenese der Bakterien sich kontinuierlich weiterentwickeln, und in Erwägung, dass jedes aktuelle Klassifizierungsschema in der Zukunft überarbeitet werden könnte, und schließlich in Erwägung, dass die

1 In Vorbereitung.

2 In Vorbereitung.

meisten Rhizobiaarten in der Alphaproteobacteria-Klasse des Phylum Proteobacteria der Rhizobiaceae-Familie zu einer der Gattungen *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* oder *Bradyrhizobium* gehören, wird für die Zwecke dieses Dokuments davon ausgegangen, dass sich die vorerwähnten Gattungen auf die Gruppe *Rhizobium* spp. beziehen.

Anmerkung 3 zum Begriff: Andere knöllchenbildende Bakterien gehören zur Gattung *Frankia* und interagieren mit nicht-leguminösen Arten, darunter die holzartigen Arten aus den Familien Betulaceae und Casuarinaceae. Solche Bakterien sollten nach den Begriffen dieses Dokuments unter die allgemeine Formulierung von „*Rhizobium*“ fallen.

[QUELLE: EN 17724:—², 3.2.2.7]

4 Zählung von *Rhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Ensifer* spp. oder *Bradyrhizobium* spp.

4.1 Allgemeines

Mit diesem Verfahren soll die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) der vorgenannten Bakterien je Gramm oder je Milliliter bestimmt werden. Damit dieses Verfahren schnell, günstig und wiederholbar ist, basiert es auf Reihenverdünnungen und Plattierung.

4.2 Probenvorbereitung

4.2.1 Allgemeines

Eine repräsentative Probe des nach den Anforderungen von EN 17702-1:—¹ zu analysierenden Produkts muss nach dem folgenden Verfahren, das die verschiedenen Formulierungen von Produkten auf Basis von Pflanzen-Biostimulanzien berücksichtigt, hergestellt werden.

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 [9] gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

4.2.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)

25 ml der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 225 ml sterile PBS gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 10 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl [9] gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

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

25 g der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 225 ml sterile PBS gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 20 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl [9] gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

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 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 [9].

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 PBS gegeben, die in einem sterilen Beutel bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird 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 dreimal wiederholt. Bei der exakten Endberechnung sind alle verwendeten Puffer zu berücksichtigen [9].

4.2.7 Feststoff – Substrat

25 g der Probe (oder mehr bei Produkten mit niedriger Konzentration) werden in 275 g sterile PBS gegeben, die in einem Kolben bei Raumtemperatur gehalten wird, und es wird mindestens 20 min lang mit einem Magnetrührer bei halber Höchstdrehzahl gerührt [9], bis die Verteilung optimal ist.

4.3 Reihenverdünnung

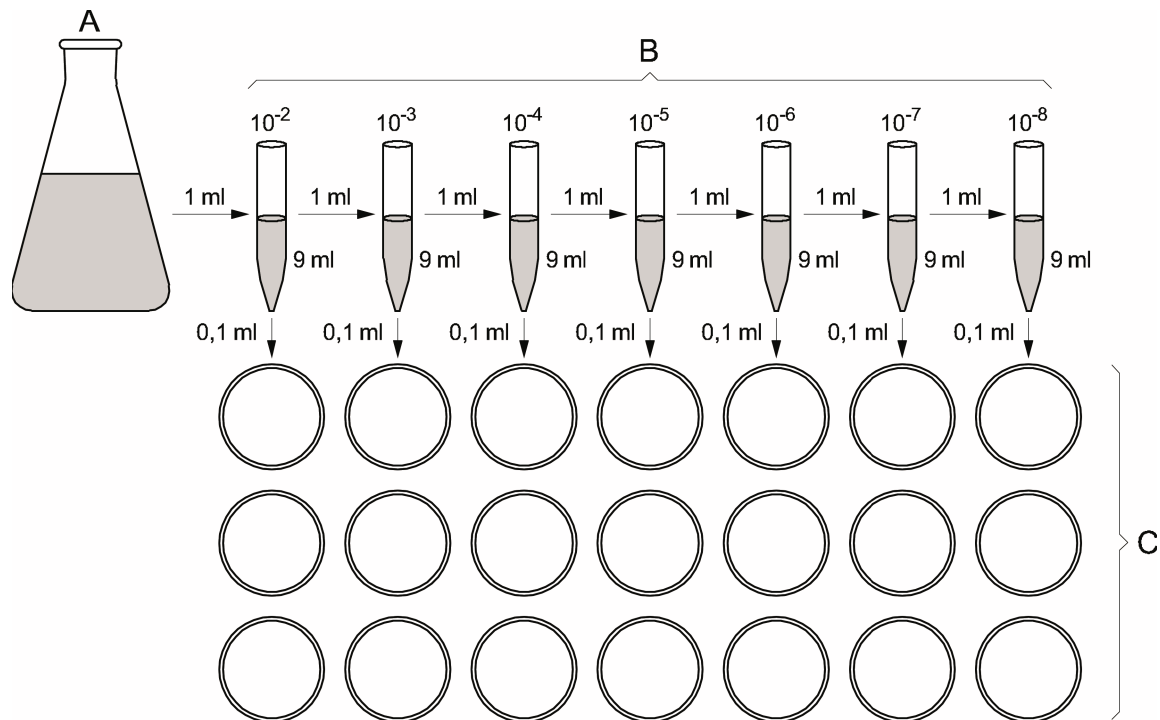
Die Auszählung von Bakterien durch Verdünnung beruht auf dem Prinzip, Reihenverdünnungen vorzunehmen, um die Bakteriendichte so weit zu reduzieren, dass einzelne Zellen unterschieden werden können. Diese darf beispielsweise als lebende Zellen unter dem Mikroskop, als Kolonien, die sich auf Platten aus einzelnen Zellen entwickeln, oder durch Schätzung bei der Pflanzeninfektionstechnik (mit dem Grundsatz, dass eine einzelne Zelle sich vermehren kann, um eine Infektion zu initiieren) erfolgen. Die Reihenverdünnung darf bei allen Arten von Formulierungen angewendet werden. In den meisten Fällen wird eine 10-fache Reihenverdünnung verwendet (Bild 1); wenn jedoch die Anzahl von Rhizobia voraussichtlich gering ist, dann darf auch eine geringere Anzahl von Verdünnungen vorgenommen werden [8].

Das Verdünnungsmittel ist die PBS (siehe Anhang A, A.5).

4.4 Herstellung der Nährmedien

Die Herstellung der Nährmedien wird 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 11133:2014³ [15] 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 die Lagerungsbedingungen entsprechend den Empfehlungen der Hersteller sicherstellen. 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 11133:2014³ [15] bewertet werden.

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



Legende

- A Suspension der Probe
- B Reihenverdünnungen
- C Petrischalen

Bild 1 — Schema von Reihenverdünnungen

Eine Probe des Produkts wird in ein Verdünnungsmittel (PBS) eingemischt, was die erste Verdünnungsstufe darstellt. Diese wird dann seriell verdünnt, wobei bei jeder Verdünnungsstufe eine Probe direkt ausplattiert wird [5].

4.5 Plattenzählungen von Rhizobia in sterilem Verdünnungsmittel

Das Zählen von Mikroorganismen auf Platten im Anschluss an eine Verdünnung wird auch als direkte Auszählung bezeichnet. Es werden nur Platten ausgezählt, auf denen sich zwischen 30 und 300 Kolonien befinden.

4.6 Auszählen von Ausstrichplatten

Die Auswahl des Mediums richtet sich nach der untersuchten Gattung unter Bezug auf Tabelle 2.

- 1) 0,1 ml der gewünschten Reihenverdünnungen (z. B. 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7}) werden auf die Oberfläche des Nährmediums in Petrischalen beimpft (Bild 1).
- 2) Das 0,1-ml-Aliquot wird mit einem sterilisierten L-förmigen Glasausstreicher (oder einem gleichwertigen Ausstreicher; z. B. einem Drigalskispatel) über dem Nährmedium ausgestrichen.
- 3) Für jede Verdünnung sollte es mindestens drei separate Parallelplatten geben.
- 4) Nach der Inokulation und Aufnahme des Inokulums in den Agar werden die Platten für einen Zeitraum von zwei bis acht Tagen (je nach Wachstumsrate der Spezies; siehe Tabelle 2) in einen Brutschrank bei etwa 28 °C gestellt.

- 5) Das Auszählen der Kolonien erfolgt anhand der Platten, bei denen die Kolonien gut voneinander abgegrenzt sind. Ist die Anzahl der Kolonien gering, kann es große Abweichungen zwischen den Platten geben und die Fehlerquote ist unter Umständen hoch. Ist die Anzahl der Kolonien zu hoch, kann das Überwachstum zu einer Unterschätzung der Anzahl führen. In zahlreichen Veröffentlichungen wird empfohlen, zwischen 30 KBE und 300 KBE je Platte zu zählen, um eine statistische Robustheit zu erreichen.

4.7 Wachstumsmedien

Für die verschiedenen Rhizobia-Spezies werden verschiedene Wachstumsmedien nach Tabelle 2 verwendet: YT-Medien für *Rhizobium* spp. (alternativ AYEM-Medien), YT-Medien für *Mesorhizobium* spp., YT-Medien für *Ensifer* spp. und R2A-Agar für *Bradyrhizobium* spp.

Tabelle 2 — Anforderungen an Medien und Bebrütung

Gattung	Medien	Literatur- hinweis für die Medien	Bedingungen	Bebrütungs- dauer	Temperatur
<i>Rhizobium</i> spp.	YT	[14]	aerob	7 bis 8 Tage	28 °C ± 2 °C [11]
	AYEM (alternative Medien)	[13]	aerob	7 bis 8 Tage	28 °C ± 2 °C
<i>Mesorhizobium</i> spp.	YT	[10]	aerob	7 bis 8 Tage	28 °C ± 2 °C
<i>Ensifer</i> spp.	YT	[11]	aerob	7 bis 8 Tage	28 °C ± 2 °C
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	R2A	[12]	aerob	7 bis 8 Tage	28 °C ± 2 °C

4.8 Berechnung

Die durchschnittliche Anzahl der KBE auf den drei Petrischalen wird durch den Kehrwert der Verdünnung, die den Messwert im Bereich von 30 bis 300 KBE ergab, dividiert und dann mit 10 multipliziert (zur Korrektur der verwendeten 0,1 ml oder g).

BEISPIEL Angenommen, der Durchschnitt von drei Platten betrug 75 KBE und die Verdünnung, die diesen Wert ergab, war eine Verdünnung im Verhältnis 10^{-6} , so wird berechnet:

Durchschnitt = 75.

Korrekturfaktor = 10.

Verdünnung der Suspension = 10^{-6} .

$KBE = 75 \times 10 \times 10^6 \Rightarrow 7,5 \times 10^8$ KBE/ml oder g.

5 Speziesbestimmung von *Rhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Ensifer* spp., *Bradyrhizobium* spp. mittels genetischer Analyse

5.1 Allgemeines

Dieses Verfahren zielt darauf ab, die Gattung und letztendlich die Spezies der Rhizobia-Gruppe mittels amplifizierter rDNA Restriktionsanalyse (ARDRA, en: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) der 16S-rRNA-Gene [10] oder mittels Gesamtgenomsequenzierung (WGS, en: Whole-Genome Sequencing) zu bestimmen.