

Deutsche Fassung

## Pflanzen-Biostimulanzien - Bestimmung der anaeroben Keimzahl

Plant biostimulants - Determination of the anaerobic plate count

Biostimulants des végétaux - Détermination du dénombrement sur plaque des germes anaérobies

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 3. Januar 2022 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser CEN/TS ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die CEN/TS in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser CEN/TS in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die CEN/TS verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine mögliche Umwandlung der CEN/TS in eine EN (parallel zur CEN/TS) beizubehalten.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

# Inhalt

|  | Seite     |
|--|-----------|
| Europäisches Vorwort .....   | 3         |
| Einleitung .....   | 4         |
| 1 Anwendungsbereich.....   | 5         |
| 2 Normative Verweisungen .....   | 5         |
| 3 Begriffe .....   | 5         |
| 4 Kurzbeschreibung .....   | 6         |
| 4.1 Allgemeines .....  | 6         |
| 4.2 Kurzbeschreibung .....   | 6         |
| 5 Nährmedien und Reagenzien.....   | 6         |
| 6 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....  | 6         |
| 7 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....   | 7         |
| 7.1 Allgemeines .....  | 7         |
| 7.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen .....  | 7         |
| 7.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC).....   | 7         |
| 7.4 Feststoff – als wasserdispergierbares Pulver (WP, en: wettable powder) formuliert.....                                   | 7         |
| 7.5 Feststoff – als wasserdispergierbares Granulat (WDG) formuliert .....  | 8         |
| 7.6 Feststoff – als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert.....                                  | 8         |
| 7.7 Feste Substrate .....  | 8         |
| 8 Durchführung.....  | 8         |
| 8.1 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen .....   | 8         |
| 8.2 Beimpfung und Bebrütung.....   | 8         |
| 8.3 Kritischer Lenkungspunkt .....   | 8         |
| 9 Berechnung.....  | 9         |
| 10 Angabe der Ergebnisse .....   | 9         |
| 11 Leistungsmerkmale des Verfahrens.....   | 9         |
| 11.1 Ringversuche.....   | 9         |
| 11.2 Empfindlichkeit.....  | 9         |
| 11.3 Spezifität .....  | 9         |
| 12 Untersuchungsbericht .....  | 9         |
| 13 Qualitätssicherung.....   | 9         |
| <b>Anhang A (informativ) Leitfaden für die Berechnung und Dokumentation der Zählungen von Anaerobierplatten (ANPC) .....</b> | <b>10</b> |
| A.1 Allgemeines .....  | 10        |
| A.2 Beispiel.....  | 10        |
| <b>Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien....</b>                                 | <b>11</b> |
| B.1 Anaerobier-Agar (ANA) .....  | 11        |
| B.1.1 Grundmedium.....   | 11        |
| B.1.2 Heminlösung .....  | 12        |
| B.1.3 Vitamin-K1-Lösung .....  | 12        |
| B.1.4 Gepuffertes Peptonwasser .....   | 12        |
| Literaturhinweise.....   | 13        |

## Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17719:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Technische Spezifikation anzukündigen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

## 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 beauftragt, europäische Normen bzw. europäische Normungsprodukte zu verfassen, die der Umsetzung der Verordnung (EU) 2019/1009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. Juni 2019 mit Vorschriften für die Bereitstellung von EU-Düngeprodukten auf dem Markt („Düngeprodukteverordnung“) dienen sollen. Dieser Normungsauftrag, vorgestellt als M/564, ist 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 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 im Bereich Biostimulanzien zu stärken und die Kommerzialisierung der europäischen Biostimulanzienindustrie zu fördern und zu unterstützen.

Biostimulanzien, die in der Landwirtschaft eingesetzt werden, können auf vielfältige Weise angewendet werden: auf dem Boden, auf Pflanzen, als Samenbehandlung usw. Ein mikrobielles Pflanzen-Biostimulans besteht aus einem Mikroorganismus oder einem Konsortium von Mikroorganismen, wie sie in der Komponentenmaterialkategorie 7 des Anhangs II der EU-Düngeprodukteverordnung (EU) 2019/1009 [1] aufgeführt sind.

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

**Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien**

|  |
|--|
| <b>Steigerung der Biodiversität</b>  |
| durch Verbesserung der Qualität/Quantität der Mikroorganismen im Boden       |
| <b>Stärkung biologischer Regulations- und Wechselwirkungsmechanismen</b>     |
| 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. Beispiel Wachstum, Stoffwechsel, Pflanzenentwicklung usw.            |
| <b>Verbesserung der biogeochemischen Kreisläufe</b>                          |
| — Verbesserung der Aufnahme von Nährstoffen                                  |
| — Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffen 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 stellt ein horizontales Verfahren zur Zählung von Mikroorganismen, die nach anaerober Bebrütung bei 30 °C in einem festen Medium wachsen und Kolonien bilden können zur Verfügung.

Das Verfahren ist auf mikrobielle Pflanzen-Biostimulanzien anwendbar, um zu überprüfen, ob die Konzentration der Anaerobier die entsprechenden Grenzwerte der EU-Düngemittelverordnung [1] nicht überschreitet.

Dieses Verfahren ist nicht anzuwenden für die mikrobiologische Überwachung der Umgebung, in der die mikrobiellen Pflanzen-Biostimulanzien hergestellt werden.

Es können keine Informationen über potentielle humanpathogene Keime aus der Auszählung der anaeroben koloniebildenden Einheiten abgeleitet werden.

## 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).

CEN/TS 17708, *Pflanzen-Biostimulanzien — Probenvorbereitung für die mikrobielle Analyse*

CEN/TS 17724, *Pflanzen-Biostimulanzien — Terminologie*

EN ISO 7218:2007<sup>1</sup>, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218:2007)*

EN ISO 11133:2014<sup>2</sup>, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133:2014)*

## 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach CEN/TS 17724 und 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

#### **Mikroorganismus**

zelluläre oder nichtzelluläre mikrobiologische Einheiten einschließlich niederer Pilze und Viren, die zur Replikation oder zur Weitergabe von genetischem Material fähig sind

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 1107/2009, Artikel 3, Punkt 15]

<sup>1</sup> Geändert durch EN ISO 7218:2007/A1:2013.

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

### 3.2

#### **fakultativer Organismus**

Mikroorganismus, der sowohl zum aeroben als auch zum anaeroben Stoffwechsel fähig ist

[QUELLE: EN ISO 11139:2018, 3.114]

### 3.3

#### **obligater Anaerobier**

Organismus, der nur in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff lebt und sich vermehrt

[QUELLE: EN ISO 11139:2018, 3.186]

### 3.4

#### **Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen**

Wert, der durch Zählung der wiedergewinnbaren koloniebildenden Einheiten ermittelt wird

[QUELLE: EN ISO 11139:2018, 3.386]

## 4 Kurzbeschreibung

### 4.1 Allgemeines

Lebensfähige anaerobe Bakterien werden mithilfe des Plattenzählverfahrens in einer anaeroben Umgebung [2] ausgezählt. Bei der Anwendung des Verfahrens muss vorsichtig vorgegangen werden, da Isolate pathogen sein können.

### 4.2 Kurzbeschreibung

Zur Herstellung einer Gussplatte wird eine feste Menge einer Verdünnung der Untersuchungsprobe in eine leere Petrischale gegeben und mit einem festgelegten geschmolzen Nähragar vermischt.

Die Platten werden unter anaeroben Bedingungen bei  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  für 48 h bis 72 h bebrütet.

Die Anzahl von Mikroorganismen je Gramm oder je Milliliter der Untersuchungsprobe wird wie in Abschnitt 9 festgelegt berechnet.

## 5 Nährmedien und Reagenzien

Zur üblichen Laborpraxis müssen CEN/TS 17708 und EN ISO 11133:2014<sup>2</sup> angewendet werden.

Die Zusammensetzung des anaeroben Agars (ANA) [3] und der Reagenzien sowie deren Herstellung sind in Anhang B beschrieben.

## 6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**6.1 Spezielle Geräte, anaerober Brutschrank**, BBL GasPak<sup>TM3</sup> oder ein gleichwertiges Gerät, ausgestattet mit GasPak<sup>TM</sup> Wasserstoff- und CO<sub>2</sub>-Entwicklerumschlägen mit Anaerob-Indikator.

---

<sup>3</sup> BBL GasPak<sup>TM</sup> und Stomacher® sind Beispiele für handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN.