# DIN EN 17711:2025-03 (D)

## Pflanzen-Biostimulanzien - Nachweis von Vibrio spp.; Deutsche Fassung EN 17711:2024

## Inhalt

Seite


Europäisches Vorwort ..... 9

Einleitung ..... 11

1 Anwendungsbereich ..... 12

2 Normative Verweisungen ..... 12

3 Begriffe ..... 12

4 Kurzbeschreibung ..... 13
4.1 Allgemeines ..... 13
4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium ..... 13
4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium ..... 14
4.4 Isolierung und Identifizierung ..... 14
4.5 Bestätigung ..... 14

5 Nährmedien und Reagenzien ..... 14
5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW) [en: alkaline saline peptone water (ASPW)] ..... 14
5.2 Feste selektive Isolierungsmedien ..... 14
5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Medium (TCBS, en: thiosulfate citrate bile and sacrose agar) ..... 14
5.2.2 Zweites Medium ..... 15
5.3 Kochsalz-Nähragar (SNA, en: saline nutrient agar) ..... 15
5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase ..... 15
5.5 Reagenzien für biochemische Untersuchungen ..... 15
5.5.1 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC) ..... 15
5.5.2 Arginin-Dihydroxylase-Salzmedium (ADH) ..... 15
5.5.3 Reagenz für den Nachweis von β-Galactosidase ..... 15
5.5.4 Salzmedium für den Nachweis von Indol ..... 15
5.5.5 Salzhaltiges Peptonwasser ..... 16
5.5.6 Natriumchloridlösung ..... 16
5.5.7 Toluol, analysenrein ..... 16
5.5.8 Steriles Mineralöl, analysenrein ..... 16

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien ..... 16

7 Probenahme ..... 16

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe ..... 17

9 Durchführung (siehe Bild A.1) ..... 17
9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung ..... 17
9.2 Primäre selektive Anreicherung ..... 18
9.3 Sekundäre selektive Anreicherung ..... 18
9.4 Isolierung und Identifizierung ..... 18
9.5 Bestätigung ..... 19
9.5.1 Allgemeines ..... 19
9.5.2 Auswahl der Kolonien für die Bestätigung und Herstellung von Reinkulturen ..... 20
9.5.3 Untersuchungen zur präsumtiven Identifizierung ..... 20
9.5.4 Biochemische Bestätigung ..... 20

**10 Angabe der Ergebnisse ... 23**

**11 Leistungsmerkmale des Verfahrens ... 23**
**11.1 Empfindlichkeit ... 23**
**11.2 Spezifität ... 23**
**11.3 LOD50 ... 23**
**11.4 Präzision ... 23**

**12 Untersuchungsbericht ... 23**

**Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens ... 25**

**Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien ... 26**
**B.1 Allgemeines ... 26**
**B.2 Wasser ... 26**
**B.3 Alkalisches Peptonwasser (APW) ... 26**
**B.3.1 Zusammensetzung ... 26**
**B.3.2 Herstellung ... 26**
**B.4 Thiosulfat-Citrat-Galle- und Saccharose-Agar (TCBS) ... 27**
**B.4.1 Zusammensetzung ... 27**
**B.4.2 Herstellung ... 27**
**B.4.3 Herstellung der Agarplatten ... 27**
**B.5 Kochsalz-Nähragar (SNA) ... 28**
**B.5.1 Zusammensetzung ... 28**
**B.5.2 Herstellung ... 28**
**B.5.3 Herstellung der Agarplatten ... 28**
**B.5.4 Herstellung der Schrägagarröhrchen mit Kochsalz-Nähragar ... 28**
**B.6 Reagenz für den Nachweis von Oxidase ... 28**
**B.6.1 Zusammensetzung ... 28**
**B.6.2 Herstellung ... 29**
**B.7 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC) ... 29**
**B.7.1 Zusammensetzung ... 29**
**B.7.2 Herstellung ... 29**
**B.8 Arginin-Dihydroxylase-Salzmedium (ADH) ... 29**
**B.8.1 Zusammensetzung ... 29**
**B.8.2 Herstellung ... 29**
**B.9 Nachweis von β-Galactosidase ... 30**
**B.9.1 ONPG-Lösung ... 30**
**B.9.2 Pufferlösung ... 30**
**B.9.3 Vollständiges Reagenz ... 30**
**B.10 Salzmedium für den Nachweis von Indol ... 31**
**B.10.1 Tryptophan-Salzmedium ... 31**
**B.10.2 Kovacs-Reagenz ... 31**
**B.11 Salzhaltiges Peptonwasser ... 31**
**B.11.1 Zusammensetzung ... 31**
**B.11.2 Herstellung ... 32**
**B.12 Natriumchloridlösung ... 32**
**B.12.1 Zusammensetzung ... 32**
**B.12.2 Herstellung ... 32**
**B.13 Tris-Acetat-EDTA-(TAE-)Puffer ... 32**
**B.13.1 Zusammensetzung ... 32**
**B.13.2 Herstellung ... 32**

**Anhang C (informativ) Konventionelle PCR für den Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus*, Genen des thermostabilen direkten Hämolysins (tdh) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolysins (trh), *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus* ... 33**
**C.1 Allgemeines ... 33**
**C.2 Geräte und Materialien ... 33**
**C.2.1 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (oder ein Puffer mit für den Zweck vergleichbarer Leistung) ... 33**

**C.2.2 Mastermix** ... **33**
**C.3 DNA-Extraktion** ... **34**
**C.4 Durchführung der konventionellen PCR** ... **34**
**C.5 Primer und Sonden** ... **35**
**C.5.1 Allgemeines** ... **35**
**C.5.2 *Vibrio-parahaemolyticus*-Primer (konventionelle PCR)** ... **36**
**C.5.3 *Vibrio-parahaemolyticus*-Primer für Gene des thermostabilen direkten Hämolysins (*tdh*) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolysins (*trh*) (konventionelle PCR)** ... **36**
**C.5.4 *Vibrio-cholerae*-Primer (konventionelle PCR)** ... **36**
**C.5.5 *Vibrio-vulnificus*-Primer (konventionelle PCR)** ... **36**
**C.5.6 PCR-Bedingungen — *VptoxR* und *VVH*** ... **36**
**C.5.7 PCR-Bedingungen — *prVC*** ... **37**
**C.5.8 PCR-Bedingungen — *tdh* und *trh*** ... **37**
**C.6 Kontrollmaterial — konventionelle PCR** ... **37**

**Anhang D (informativ) Real-Time-PCR für den Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus*, dem Gen des thermostabilen direkten Hämolysins (*tdh*) und *Vibrio vulnificus*** ... **39**
**D.1 Allgemeines** ... **39**
**D.2 Geräte und Materialien** ... **39**
**D.2.1 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (oder ein Puffer mit für den Zweck vergleichbarer Leistung)** ... **39**
**D.2.2 Mastermix** ... **39**
**D.2.3 Zusammensetzung des Mastermix** ... **39**
**D.3 DNA-Extraktion** ... **39**
**D.4 Real-Time-PCR** ... **40**
**D.5 *Vibrio parahaemolyticus* — Primer und Hydrolyse-Sonden** ... **40**
**D.6 *Vibrio parahaemolyticus* — Primer und Hydrolyse-Sonden für das Gen des thermostabilen direkten Hämolysins (*tdh*)** ... **41**
**D.7 *Vibrio vulnificus* — Primer und Hydrolyse-Sonden** ... **41**
**D.8 PCR-Bedingungen** ... **41**
**D.9 Kontrollmaterial — Real-Time-PCR** ... **41**

**Anhang E (informativ) Wiederholpräzision und Vergleichpräzision** ... **43**
**E.1 Allgemeines** ... **43**
**E.2 Proben** ... **43**
**E.3 Durchführung** ... **44**
**E.4 Wiederholungen** ... **44**
**E.5 Ergebnisse** ... **44**

**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** ... **46**

**Literaturhinweise** ... **47**

**Bilder**

**Bild A.1 — Fließschema des Verfahrens für den Nachweis von enteropathogenen *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*** ... **25**

**Tabellen**

**Tabelle 1 — Leistungsprüfung des Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Mediums (TCBS)** ... **15**

**Tabelle 2 — Primäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand** ... **18**

**Tabelle 3 — Sekundäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand** ..... **18**

**Tabelle 4 — Interpretation der biochemischen Untersuchungen** ..... **22**

**Tabelle C.1 — Zusammensetzung des Mastermix** ..... **34**

**Tabelle C.2 — PCR-Bedingungen — *VptoxR* und *VVH*** ..... **37**

**Tabelle C.3 — PCR-Bedingungen — *prVC*** ..... **37**

**Tabelle C.4 — PCR-Bedingungen — *tdh* und *trh*** ..... **37**

**Tabelle C.5 — Referenzstämme** ..... **38**

**Tabelle D.1 — Zusammensetzung des Mastermix** ..... **39**

**Tabelle D.2 — PCR-Bedingungen** ..... **41**

**Tabelle D.3 — Referenzstämme** ..... **42**

**Tabelle E.1 — Im Ringversuch untersuchte Materialien** ..... **43**

**Tabelle E.2 — Ergebnisse des Ringversuchs** ..... **45**

**Tabelle E.3 — Kontingenztabelle für die Proben ML, MS, BL und PS** ..... **45**

**Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009** ..... **46**