

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 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , Genen des thermostabilen direkten Hämolytins (tdh) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolytins (trh), <i>Vibrio cholerae</i> und <i>Vibrio vulnificus</i>		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	<i>Vibrio-parahaemolyticus</i> -Primer (konventionelle PCR).....	36
C.5.3	<i>Vibrio-parahaemolyticus</i> -Primer für Gene des thermostabilen direkten Hämolysins (<i>tdh</i>) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolysins (<i>trh</i>) (konventionelle PCR)	36
C.5.4	<i>Vibrio-cholerae</i> -Primer (konventionelle PCR).....	36
C.5.5	<i>Vibrio-vulnificus</i> -Primer (konventionelle PCR).....	36
C.5.6	PCR-Bedingungen — <i>VptoxR</i> und <i>VVH</i>	36
C.5.7	PCR-Bedingungen — <i>prVC</i>	37
C.5.8	PCR-Bedingungen — <i>tdh</i> und <i>trh</i>	37
C.6	Kontrollmaterial — konventionelle PCR.....	37
Anhang D (informativ) Real-Time-PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i>, dem Gen des thermostabilen direkten Hämolysins (<i>tdh</i>) und <i>Vibrio vulnificus</i>		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	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> — Primer und Hydrolyse-Sonden.....	40
D.6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> — Primer und Hydrolyse-Sonden für das Gen des thermostabilen direkten Hämolysins (<i>tdh</i>)	41
D.7	<i>Vibrio vulnificus</i> — 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 <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> und <i>V. vulnificus</i>	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 — <i>VptoxR</i> und <i>VVH</i>	37
Tabelle C.3 — PCR-Bedingungen — <i>prVC</i>	37
Tabelle C.4 — PCR-Bedingungen — <i>tdh</i> und <i>trh</i>	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