

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 Hämolsins (<i>tdh</i>) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolsins (<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 Hämolsins (<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 Hämolsins (<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