

DIN EN 17477



ICS 13.020.55

**Algen und Algenprodukte –
Identifizierung der Biomasse von Mikroalgen, Makroalgen, Cyanobakterien
und Labyrinthulomycetes –
Erkennung und Identifizierung mit morphologischen und/oder
molekularen Verfahren;
Deutsche Fassung EN 17477:2021**

Algae and algae products –
Identification of the biomass of microalgae, macroalgae, cyanobacteria and
Labyrinthulomycetes –
Detection and identification with morphological and/or molecular methods;
German version EN 17477:2021

Algues et produits d'algues –
Identification de la biomasse de microalgues, macroalgues, cyanobactéries et
Labyrinthulomycètes –
Détection et identification à l'aide de méthodes morphologiques et/ou moléculaires;
Version allemande EN 17477:2021

Gesamtumfang 31 Seiten

DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17477:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 172-00-16 AA „Algen und Algenprodukte“ im DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS).

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 21569	siehe	DIN EN ISO 21569
ISO 21571	siehe	DIN EN ISO 21571
ISO 24276:2006	siehe	DIN EN ISO 24276:2006-05

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN EN ISO 21569, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren*

DIN EN ISO 21571, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Nukleinsäureextraktion*

DIN EN ISO 24276:2006-05, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO 24276:2006); Deutsche Fassung EN ISO 24276:2006*

Deutsche Fassung

**Algen und Algenprodukte —
Identifizierung der Biomasse von Mikroalgen, Makroalgen,
Cyanobakterien und Labyrinthulomycetes —
Erkennung und Identifizierung mit morphologischen
und/oder molekularen Verfahren**

Algae and algae products —
Identification of the biomass of microalgae, macroalgae,
cyanobacteria and Labyrinthulomycetes —
Detection and identification with morphological and/or
molecular methods

Algues et produits d'algues —
Identification de la biomasse de microalgues,
macroalgues, cyanobactéries et Labyrinthulomycètes —
Détection et identification à l'aide de méthodes
morphologiques et/ou moléculaires

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 7. Juni 2021 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

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	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Abkürzungen	11
5 Reagenzien	12
5.1 Reagenzien für morphologische Verfahren	12
5.1.1 Isotonische Lösung	12
5.2 Reagenzien für molekulare Verfahren	12
5.2.1 Primer	12
5.2.2 Desoxynukleotid-Triphosphat-Mix (dNTPs)	12
5.2.3 Thermostabile DNS-Polymerase	12
5.2.4 PCR-Reaktionspuffer	12
5.2.5 Agarose-Gel	12
5.2.6 Gelelektrophorese-Puffer	13
5.2.7 Beladungspuffer	13
5.2.8 DNS-Leiter	13
6 Prüfeinrichtung	13
6.1 Allgemeines	13
6.2 Geräte für morphologische Identifizierungsverfahren	13
6.2.1 Schwach vergrößerndes optisches System	13
6.2.2 Lichtmikroskop	13
6.2.3 Wissenschaftliche Literatur zur Taxonomie	14
6.2.4 Objektträger für die Mikroskopie	14
6.2.5 Deckglas für die Mikroskopie	14
6.3 Geräte für molekulare Identifizierungsverfahren	14
6.3.1 Thermocycler	14
6.3.2 Gerät für die Gelelektrophorese	14
6.3.3 DNS-Sequenziergerät	14
6.3.4 Kunststoff-Verbrauchsmaterialien, DNS-frei, für Einmalgebrauch	14
7 Kurzbeschreibung	15
7.1 Allgemeines	15
7.2 Morphologische Verfahren	15
7.3 Molekulare Verfahren	15
8 Durchführung	15
8.1 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien	15
8.2 Auswahl der Verfahren	15
9 Morphologische Identifizierungsverfahren	17
9.1 Allgemeines	17
9.2 Makroskopische Identifizierung mit bloßem Auge oder einem Vergrößerungsglas	17
9.3 Lichtmikroskopie	17
9.3.1 Allgemeines	17

9.3.2	Färbung.....	17
9.3.3	Vorbereitung von mikroskopischen Objektträgern.....	17
9.3.4	Mikroskopische Identifizierung.....	18
9.3.5	Verwendung von Bestimmungsschlüsseln	18
10	Molekulare Identifizierungsverfahren.....	18
10.1	Allgemeines	18
10.2	DNS-Extraktion und -Aufreinigung	19
10.3	DNS-Amplifikation	19
10.3.1	Kurzbeschreibung der DNS-Amplifikation	19
10.3.2	Verfahren	19
10.4	Auswahl der Primer.....	20
10.5	Kontrollreaktionen.....	20
10.6	Beurteilung der PCR-Produkte.....	21
10.7	Klonierung der PCR-Produkte.....	21
10.8	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	21
10.9	Auswertung der Sequenzdaten	22
10.10	Sequenzanalyse/-vergleich mit Referenz-Sequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken.....	22
11	Untersuchungsbericht.....	23
Anhang A (informativ) Beispiele für einsetzbare Primer		24
A.1	Einleitung	24
A.2	Prokaryotische Primer, spezifisch für Cyanobakterien.....	24
A.2.1	Primer für 16S-rDNS-Genamplifikation.....	24
A.2.2	Primer für 16S-rDNS-Gensequenzierung	24
A.3	Eukaryotische Primer, allgemeinerer Natur (Mikroalgen, Labyrinthulomycetes, Makroalgen)	24
A.3.1	Primer für 18S-rDNS-Genamplifikation.....	24
A.3.2	Primer für <i>COX1</i> -Genamplifikation.....	25
A.3.3	Primer für <i>tufA</i> -Genamplifikation.....	25
A.3.4	Primer für <i>rbcL</i> -Genamplifikation	25
A.4	Sequenzierungsprimer.....	25
Anhang B (informativ) Wissenschaftliche Literatur, die für die Identifizierung verwendet werden kann		26
Literaturhinweise.....		28

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17477:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Februar 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2022 zurückgezogen werden.

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, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

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 Europäische Norm zu übernehmen: 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 Fachleuten des CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet.

Das Europäische Komitee für Normung (CEN) wurde von der Europäischen Kommission (EK) beauftragt, europäische Normen oder europäische Normungsergebnisse zu erarbeiten, um die Umsetzung von Artikel 3 der Richtlinie 2009/28/EG für Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte zu unterstützen.

Dieser als Normungsauftrag M/547 vorgelegte Auftrag trägt auch zum Informationsaustausch über „Innovation für nachhaltiges Wachstum: Eine Bioökonomie für Europa“ bei.

Die frühere Arbeitsgruppe 218 „Algen“ des Technischen Lenkungsausschusses von CEN wurde im Jahr 2016 gegründet, um ein Arbeitsprogramm als Teil dieses Normungsauftrages zu erarbeiten. Das Technische Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ wurde gebildet, um das Arbeitsprogramm auszuführen, mit dem eine Normenreihe erarbeitet wird.

Das Interesse an Algen und algenbasierten Produkten oder Zwischenprodukten als wertvolle Quelle, u. a. von Kohlenhydraten, Proteinen, Lipiden und verschiedenen Pigmenten, hat in Europa deutlich zugenommen. Diese Stoffe eignen sich für ein breites Spektrum von Anwendungen, von Lebensmitteln und Futtermitteln bis hin zu anderen Bereichen wie Textilien, Kosmetika, Biopolymeren, Biokraftstoffen und Dünger/Biostimulanzien. Es wurde festgestellt, dass die Normung eine wichtige Rolle spielt, um die Nutzung von Algen und Algenprodukten zu fördern.

Die Arbeit des CEN/TC 454 sollte die Zuverlässigkeit der Lieferkette verbessern und so das Vertrauen der Industrie und der Verbraucher in Algen steigern, zu denen Makroalgen, Mikroalgen, Cyanobakterien, Labyrinthulomycetes (Netzschleimpilze), algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte gehören, und wird die Kommerzialisierung der europäischen Algenindustrie fördern und unterstützen.

Dieses Dokument wurde mit dem Ziel erarbeitet, die horizontalen Definitionen für Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte zu erfassen. Folglich sind in den anderen vom CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeiteten Normen andere Begriffe und Definitionen enthalten.

Hinsichtlich des Lebens- und Futtermittelbereichs sowie für Anwendungen, die nicht für Lebensmittel- bzw. Futtermittelzwecke vorgesehen sind, können in anderen produktspezifischen Normen unter Umständen weitere Definitionen vorkommen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für den Nachweis und die Identifizierung von Mikroalgen, Makroalgen, Cyanobakterien und Labyrinthulomycetes (Netzscheimpilze) mittels morphologischer und/oder molekularer Verfahren fest.

Die in diesem Dokument dargelegten morphologischen Verfahren sind anzuwenden für geerntete feuchte Biomasse und geerntete trockene, ungemahlene Biomasse von Mikroalgen, Makroalgen, Cyanobakterien und Labyrinthulomycetes, die für die Weiterverarbeitung und/oder Verwendung kultiviert und/oder geerntet wurden.

Die in diesem Dokument dargelegten molekularen Verfahren sind anzuwenden für geerntete feuchte Biomasse und geerntete trockene und/oder gemahlene Biomasse von Mikroalgen, Makroalgen, Cyanobakterien und Labyrinthulomycetes, die für die Weiterverarbeitung und/oder Verwendung kultiviert und/oder geerntet wurden.

In diesem Dokument wird eine Sammlung von Verfahren beschrieben, die aus mehreren Identifizierungsverfahren besteht, welche je nach Anwendbarkeit und Zweck der Identifizierung gewählt werden können:

- morphologische Verfahren, die auf Beobachtung unter Bezug auf die wissenschaftliche Literatur zur Taxonomie basieren:
 - makroskopische Identifizierung;
 - lichtmikroskopische Identifizierung;
- molekulare Verfahren zur Sequenzierung und zum Sequenzvergleich („Blasting“):
 - 16S-rDNS-Sequenzierung;
 - 18S-rDNS-Sequenzierung;
 - *rbcL*-DNS-Sequenzierung;
 - ITS-Sequenzierung;
 - *COX1*-Gensequenzierung;
 - *tufA*-Gensequenzierung.

Dieses Dokument behandelt weder die genetische Reinheit der untersuchten Biomasse noch die Quantifizierung der identifizierten Taxa.

Dieses Dokument ist nicht geeignet für die Analyse von stark verarbeiteter Biomasse mit hochgradig abgebauter DNS, bei der die Länge der Fragmente für die Amplifikation der Targets nicht ausreichend ist, und bei der die morphologischen Merkmale nicht beurteilt werden können.

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).

ISO 24276:2006, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

EN 17399:2020, *Algen und Algenprodukte — Begriffe*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 17399:2020, ISO 24276:2006 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

16S-rDNS-Sequenzierung

Prozess zur Bestimmung der Nukleotidsequenz in einem vollständigen Gen oder in einem Abschnitt eines Gens, das für die 16S-ribosomale Ribonukleinsäure codiert

Anmerkung 1 zum Begriff: Der größte Anteil der Sequenzierungsarbeiten bezüglich des 16S-rDNS-Gens betrifft Prokaryoten.

3.2

18S-rDNS-Sequenzierung

Prozess zur Bestimmung der Nukleotidsequenz in einem vollständigen Gen oder in einem Abschnitt eines Gens, das für die 18S-ribosomale Ribonukleinsäure codiert

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Sequenzierungsarbeiten bezüglich des 18S-rDNS-Gens betrifft Eukaryoten.

3.3

Alignierung

Alignment

Prozess oder Ergebnis des Abgleichs der Nukleotidreste von zwei oder mehreren biologischen Sequenzen, um einen maximalen Grad der Identität zu erreichen

3.4

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST

hinsichtlich Geschwindigkeit optimierter Sequenzvergleich-Algorithmus, der zur Recherche in Sequenzdatenbanken verwendet wird, um optimale lokale Alignierungen (Alignments) bei einer Abfrage zu erhalten

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieser Algorithmus approximiert Alignments direkt so, dass ein Maß für die lokale Ähnlichkeit, der Wert für das Signalpaar mit maximalem Signal (MST-Score) oder der Wert für ein Segmentpaar mit hoher Übereinstimmung (HSP-Score), optimiert wird.

[QUELLE: ISO 20813:2019, 3.1, modifiziert — Anmerkung 2 zum Begriff und Anmerkung 3 zum Begriff wurden gelöscht.]

3.5

Blasting von Sequenzen

Sequenzvergleich gegen häufig verwendete Gensequenz-Datenbanken unter Verwendung des BLAST-Algorithmus

3.6

COX1-Gensequenzierung

Prozess zur Bestimmung der Sequenz des *COX1*-Gens, das für die Untereinheit 1 der Cytochrom-C-Oxidase codiert

Anmerkung 1 zum Begriff: In der Literatur wird das *COX1*-Gen auch als CO1 oder COI bezeichnet.

3.7

Nachweis

Auffinden des Zielorganismus mittels eines geeigneten Verfahrens

3.8

DNS-Extraktion

Probenbehandlung zur Freisetzung und Trennung der DNS von anderen zellulären Bestandteilen

[QUELLE: ISO 16577:2016, 3.44, modifiziert — das Wort „liberation“ wurde durch „release“ ersetzt.]

3.9

DNS-Reinigung

Verfahren, das zu einer stärker gereinigten DNS führt

Anmerkung 1 zum Begriff: In diesem Zusammenhang bezieht sich Reinheit auf das Verringern wahrnehmbarer und messbarer Auswirkungen von PCR-Inhibitoren.

[QUELLE: ISO 24276:2006, 3.2.2]

3.10

DNS-Sequenz

Abfolge der Nukleotide in einem Desoxyribonukleinsäure-Molekül

3.11

externe Amplifikationskontrolle

aufgestockte Amplifikationskontrolle

DNS, die zu einem Aliquot der extrahierten Nukleinsäure in einer festgelegten Menge oder Anzahl an Kopien hinzugefügt wird und als Kontrolle hinsichtlich der Amplifikation bei nukleinsäurebasierten Reaktionen dient

[QUELLE: ISO 16577:2016, 3.60]

3.12

FASTA

Repräsentation einer genomischen Information (GIR, en: genomic information representation), bestehend aus einem Namen und einer Nukleotidsequenz für jeden bei einer Sequenzierung erhaltenen Read einer Sequenz

[QUELLE: ISO/IEC 23092-2:2020, 3.7, modifiziert — Anmerkung 1 zum Begriff wurde weggelassen.]

3.13

GenBank

umfangreiche öffentlich zugängliche Datenbank von genetischen Referenz-Sequenzen

Anmerkung 1 zum Begriff: GenBank am National Center for Biotechnology Information (NCBI) ist Bestandteil der International Nucleotide Sequence Database Collaboration, zu der außerdem die DNA Data Bank of Japan (DDBJ) und das European Nucleotide Archive (ENA) gehören. Diese drei Organisationen führen täglich einen Datenaustausch durch.

3.14

interne Amplifikationskontrolle

Gensequenz, die von Natur aus in der Template-DNS vorkommt und als Kontrolle hinsichtlich der Amplifikation bei nukleinsäurebasierten Reaktionen dient

Anmerkung 1 zum Begriff: Als eine interne Amplifikationskontrolle kann ein Haushaltsgen mit bekannter Kopienanzahl/bekanntem Genom verwendet werden.