

DIN EN 17712



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-06-07
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17712:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Nachweis von Staphylococcus aureus;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17712:2023**

Plant biostimulants –
Detection of Staphylococcus aureus;
German and English version prEN 17712:2023

Biostimulants des végétaux –
Détection de Staphylococcus aureus;
Version allemande et anglaise prEN 17712:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-04-07 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 38 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17712:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-06 AA „Pflanzen-Biostimulanzien“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

Änderungen

Gegenüber DIN CEN/TS 17712:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Veröffentlichungsform von einer Technischen Spezifikation zu einer Europäischen Norm;
- b) Ergänzung von Kaliumtellurit-Lösung als A.3.2 und Kompletten Medium (modifizierte Giolitti-Cantoni-Bouillon) als A.3.3;
- c) Ergänzung des informativen Anhangs B mit Ringversuchsdaten zur Wiederhol- und Vergleichpräzision des Verfahrens;
- d) Ergänzung des informativen Anhangs ZA zum Zusammenhang mit der Verordnung für EU-Düngeprodukte.

Pflanzen-Biostimulanzien – Nachweis von Staphylococcus aureus

Plant biostimulants – Detection of Staphylococcus aureus

Biostimulants des végétaux – Détection de Staphylococcus aureus

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
5 Probenahme	8
6 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	8
7 Verfahren	8
7.1 Allgemeines	8
7.2 Verdünnungsmittel	9
7.3 Modifizierte Giolitti-Cantoni-Bouillon	9
7.4 Baird-Parker-Agarmedium	9
8 Geräte und Glasgeräte	9
9 Vorgehensweise	10
9.1 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen	10
9.1.1 Allgemeines	10
9.1.2 Feste Formulierungen	10
9.1.3 Flüssige Formulierungen	10
9.2 Anreicherung und Isolierung	10
9.3 Auswahl der Platten und Auswertung	11
10 Präzision	11
11 Untersuchungsbericht	11
12 Leistungsmerkmale des Verfahrens	12
12.1 Ringversuche	12
12.2 Empfindlichkeit	12
12.3 Spezifität	12
12.4 Positiver Vorhersagewert (PPV, en: positive predictive value)	12
12.5 Negativer Vorhersagewert (NPV, en: negative predictive value)	12
Anhang A (normativ) Medienzusammensetzung und -vorbereitung	13
A.1 Baird-Parker-Kaninchenplasma/Fibrinogen-Agar (RPF-Agar) [4] [5] [6]	13
A.2 Gepuffertes Peptonwasser (BPW, en: buffered peptone water)	13
A.3 Modifizierte Giolitti-Cantoni-Bouillon	13
A.3.1 Grundmedium	13
A.3.2 Kaliumtelluritlösung	14
A.3.3 Vollständiges Medium (modifizierte Giolitti-Cantoni-Bouillon)	14
Anhang B (informativ) Wiederholpräzision und Vergleichpräzision des Verfahrens	15
B.1 Im Ringversuch verwendete Materialien	15
B.2 Ergebnisse des Ringversuchs	15
B.3 Analyse der Kontingenztafel	16
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	17
Literaturhinweise	18

Tabellen

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien [1]	5
---	---

Tabelle B.1 — Materialien, die im Ringversuch zum Nachweis von <i>S. aureus</i> in Pflanzen-Biostimulanzen untersucht wurden	15
Tabelle B.2 — Ergebnisse des Ringversuchs zum Nachweis von <i>S. aureus</i> in Pflanzen-Biostimulanzen	16
Tabelle B.3 — Kontingenztabelle des Ringversuchs zum Nachweis von <i>S. aureus</i> in Pflanzen-Biostimulanzen	16
Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	17

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17712:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN/TS 17712:2022 ersetzen.

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-Richtlinie(n)/Verordnung(en).

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinie(n)/Verordnung(en) siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

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 (EC) beauftragt, Europäische Normen bzw. europäische Normungsergebnisse zu verfassen, die der Umsetzung der Verordnung (EU) 2019/1009 vom 5. Juni 2019 mit Vorschriften für die Bereitstellung von EU-Düngeprodukten auf dem Markt („Düngeprodukteverordnung“) dienen sollen.

Dieser Normungsauftrag, vorgestellt als SR M/564 und M/564/Amd1, ist auch ein Beitrag zur Strategie „Innovating for Sustainable Growth: A Bio economy for Europe“. Im Rahmen dieses Auftrags 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 in Pflanzen-Biostimulanzien zu stärken, und wird die Kommerzialisierung der europäischen Biostimulanzienindustrie fördern und unterstützen.

Biostimulanzien, die in der Landwirtschaft eingesetzt werden, können auf vielfältige Weise am Boden, an Pflanzen, als Samenbehandlung usw. angewendet werden. Ein mikrobielles Pflanzen-Biostimulans besteht aus einem Mikroorganismus oder einem Konsortium von Mikroorganismen, wie in der Komponentenmaterialkategorie 7 des Anhangs II der EU-Düngeprodukteverordnung angegeben.

Dieses Dokument ist für alle mikrobiellen Biostimulanzien in der Landwirtschaft anwendbar.

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

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien [1]

Erhöhung der Biodiversität
durch Verbesserung der Qualität/Quantität der Mikroorganismen im Boden
Stärkung biologischer Regulationen und Wechselwirkungen
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
— zum Beispiel Wachstum, Stoffwechsel, Pflanzenentwicklung ...
Verbesserung der biogeochemischen Kreisläufe
— Verbesserung der Aufnahme von Nährstoffelementen
— Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffelementen im Boden
— Stimulierung 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 Verfahren zur Verfügung, mit dem verifiziert werden kann, dass das Pathogen *Staphylococcus aureus* in Pflanzen-Biostimulanzien die Grenzwerte der EU-Düngeprodukteverordnung [2] nicht überschreitet.

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).

EN 17724:—¹, *Biostimulanzien für die pflanzliche Anwendung — Terminologie*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach prEN 17724:—² 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

Staphylococcus aureus

Bakterium, das auf dem angegebenen Selektivmedium nach 24 h Bebrütung bei einer Temperatur von 37 °C unter aeroben Bedingungen Kolonien bildet, die der Beschreibung der Art entsprechen

Anmerkung 1 zum Begriff: Beschreibung der Kolonien von *S. aureus*:

- kugelförmig;
- konvex;
- ganzrandig;
- grau bis schwarz (durch die Reduktion von Kaliumtellurit zu Tellurid).

Anmerkung 2 zum Begriff: Der Koloniedurchmesser variiert zwischen 1 mm und 2 mm.

Anmerkung 3 zum Begriff: *S. aureus* ist ein fakultativ anaerober, grampositiver Kokkus, der unter dem Mikroskop als traubenförmige Haufen erscheint und bei Züchtung auf selektiven Blutagarplatten runde, zumeist goldgelbe Kolonien, oft mit Hämolyse, aufweist.

Anmerkung 4 zum Begriff: Der Begriff „koagulase-positive Staphylokokken“ bezieht sich auf Bakterien, die auf der Oberfläche eines selektiven Nährmediums typische und/oder atypische Kolonien bilden und eine positive Koagulasereaktion zeigen, wenn die Untersuchung nach dem in diesem Dokument angegebenen Verfahren durchgeführt wird.

1 In Vorbereitung. Stufe zum Zeitpunkt der Veröffentlichung: prEN 17724:2023.

2 In Vorbereitung.

3.2

Nachweis der koagulase-positiven *Staphylokokken*

Ermittlung des Nachweises oder Nichtnachweises von *Staphylococcus aureus* (3.2) in 25 g oder 25 ml eines Produktes, wenn die Untersuchungen nach diesem Dokument durchgeführt werden

4 Kurzbeschreibung

Nach der Probenvorbereitung, die spezifisch für mikrobielle Biostimulanzien ist, erfolgt der Nachweis von *Staphylococcus aureus*. Diesbezüglich wird auf die Abschnitte der EN ISO 6888-3:2003 verwiesen, die sich mit der physikalischen/chemischen Beschaffenheit der Untersuchungsprobe für den Nachweis von *Staphylococcus aureus* befassen. Wenn das Produkt flüssig ist, wird ein bestimmtes Volumen der Untersuchungsprobe auf ein flüssiges Selektivnährmedium überimpft. Bei anders formulierten Produkten wird ein bestimmtes Volumen einer Erstverdünnung auf das Selektivmedium überimpft. Die Bebrütung erfolgt unter anaeroben Bedingungen 24 h und 48 h bei 37 °C.

Es könnten Plattengussverfahren und Spatelplattenverfahren verwendet werden. Das Spatelplattenverfahren wird als ausreichend angesehen, um das Vorliegen dieser Spezies nachzuweisen. In diesem Fall könnte die Beimpfung mit einer sterilen Öse (die ungefähr 10 µl des Produkts, der Verdünnung oder der Suspension enthält) erfolgen, um isolierte Kolonien zu erhalten, ohne nach dem Plattengussverfahren zu verfahren, das normalerweise für die Zählung verwendet wird.

Wird das Plattengussverfahren durchgeführt, sollten die folgenden Verfahrensschritte berücksichtigt werden. Festes Selektivnährmedium durch Plattengussverfahren, mit einer bestimmten Menge der Erstverdünnung. Beimpfung, unter den gleichen Bedingungen, mit Dezimalverdünnungen der Erstverdünnung. Die Platten werden bei 37 °C aerob bebrütet und gegebenenfalls sowohl nach 24 h als auch nach 48 h untersucht. Die Angabe des Ergebnisses erfolgt als Vorliegen oder Nichtvorliegen des betreffenden Keims in einer Prüfmenge von 25 g oder 25 ml.

5 Probenahme

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens (siehe prEN 17702-1³, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst). Liegt keine spezifische Internationale oder Europäische Norm vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die repräsentativ ist und während des Transports oder der Lagerung nicht verändert wurde.

6 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Erstverdünnung wird aus mindestens 25 g oder 25 ml des gut gemischten Produkts und der entsprechenden Menge des Verdünnungsmittels hergestellt, so dass sich ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 10 ergibt. So wird sichergestellt, dass eine repräsentative Probe der Produktmaterialien erhalten wird.

7 Verfahren

7.1 Allgemeines

Nach der Probenvorbereitung, die spezifisch für mikrobielle Biostimulanzien ist, erfolgt der Nachweis von *Staphylococcus aureus*. Es wird auf EN ISO 6888 verwiesen, um *Staphylococcus aureus* nach diesem Verfahren nachzuweisen.

³ In Vorbereitung.

7.2 Verdünnungsmittel

Siehe EN ISO 6887-1 und die spezifische Norm, die sich mit dem zu analysierenden Produkt befasst.

7.3 Modifizierte Giolitti-Cantoni-Bouillon

Siehe Anhang A.

7.4 Baird-Parker-Agarmedium

Siehe Anhang A.

8 Geräte und Glasgeräte

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors (für weitere Einzelheiten siehe EN ISO 7218:2007) und insbesondere Folgendes:

8.1 Gerät zur Dampfsterilisation (Autoklav).

Vor der Sterilisation werden alle Geräte aus Glas und Metall, die im Autoklav zu sterilisieren sind, gereinigt.

Werden Volumenmessgeräte aus Glas sterilisiert, ist die Genauigkeit der gemessenen Volumina regelmäßig zu überprüfen.

Die Temperatur muss im gesamten Autoklav einheitlich sein. Er muss mit einem Thermostat und einem Thermometer oder einem Temperaturaufzeichnungsgerät mit geeigneter Genauigkeit ausgestattet sein.

Er sollte mit einer Zeitanzeige, einem Programmgeber oder einer Zeitschaltuhr ausgestattet sein.

Nach der Sterilisation sollten die Glasgeräte vor der Entnahme im Autoklav abkühlen, um Risse zu vermeiden.

8.2 Brutschrank, der die beimpften Medien, Platten und Röhrchen innerhalb eines Temperaturbereichs von $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ aufrechterhalten kann.

8.3 Trocken- oder Brutschrank, der $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ aufrechterhalten kann.

8.4 Wasserbad oder ähnliches Gerät, das $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ aufrechterhalten kann.

8.5 Kulturröhrchen, Kolben oder Flaschen mit Schraubverschluss und geeignetem Fassungsvermögen, für die Sterilisation und Lagerung von Nährmedien und die Bebrütung von flüssigen Medien; insbesondere sterile Hämolyseröhrchen oder Rundbodenflaschen mit den ungefähren Abmessungen $10\text{ mm} \times 75\text{ mm}$.

8.6 Petrischalen, steril, aus Glas oder Kunststoff.

8.7 Glatter Impfdraht, bei Umgang mit pathogenen Bakterien bevorzugt, da er Spritzer vermeidet und das Risiko einer Kreuzkontamination ausschließt.

8.8 Ausglühgerät, zur Sterilisation von Metallimpfösen und glatten Impfdrähten.

8.9 Pasteurpipette

8.10 Messpipetten mit Vollablauf, Nennvolumen 1 ml, 2 ml und 10 ml, mit einer Skalenteilung von 0,1 ml, 0,1 ml bzw. 0,5 ml.

8.11 Ausstreicher, steril, aus Glas oder Kunststoff.

8.12 pH-Messgerät, bei 25 °C auf 0,01 pH-Einheiten ablesbar, ermöglicht Messungen mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ pH-Einheiten.

8.13 Paddle Blender zum Extrahieren und Spülen von intakten Mikroben in eine Lösung, die dann für nachgeschaltete Analysen verwendet wird.

9 Vorgehensweise

9.1 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen

9.1.1 Allgemeines

Siehe prEN 17708⁴ und die spezifische Norm für das entsprechende Produkt.

Eine repräsentative Probe des Produkts wird nach dem folgenden Verfahren hergestellt, das die verschiedenen Formulierungen von Produkten auf Basis von Biostimulanzien berücksichtigt:

- 25 g der Probe werden in 225 ml gepuffertes Peptonwasser (BPW, en: buffered peptone water) gegeben (x ml oder x g der Prüfmenge zu 9x ml Verdünnungsmittel).

9.1.2 Feste Formulierungen

- Unmittelbar danach wird die gesamte Suspension in einem Paddle Blender 2 min lang bei höchster Drehzahl aufbereitet.
- Die gesamte Suspension wird in 2 250 ml (90x ml) einfach konzentrierte modifizierte Giolitti-Cantoni-Bouillon überführt.
- Anschließend erfolgt die Bebrütung.

9.1.3 Flüssige Formulierungen

- Unmittelbar danach wird die gesamte Suspension in 2 250 ml (90x ml) einfach konzentrierte modifizierte Giolitti-Cantoni-Bouillon überführt.
- Anschließend erfolgt die Bebrütung.

9.2 Anreicherung und Isolierung

Die Erstverdünnung wird $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ bei 37 °C anaerob bebrütet. Die Anaerobiose kann erreicht werden, indem Paraffin auf die Suspension gegeben wird. Wird eine Schwarzfärbung oder ein schwarzer Niederschlag festgestellt, erfolgt als Nächstes die Beimpfung von selektiven Agarmedien. Wenn sich keine Schwarzfärbung entwickelt hat, wird weitere $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ bei 37 °C bebrütet; anschließend werden die Baird-Parker-Agarplatten beimpft.

Nach der Bebrütung werden 1,0 ml der Suspensionen mittels Plattengussverfahren auf Baird-Parker-Agar, angereichert mit Kaninchenplasma/Fibrinogen (RPF), überimpft. Beim Spatelplattenverfahren werden 0,1 ml der Suspensionen mit einer Öse auf Baird-Parker-RFP-Agar überimpft. Das Medium wird 24 h bis 48 h bei 37 °C bebrütet.

ANMERKUNG 1 Liegt eine Störf flora in hoher Konzentration vor, bildet sich möglicherweise kein Hof aus. Es ist notwendig, mehrere Verdünnungen vorzunehmen, um gut abgegrenzte Kolonien zu erhalten.

⁴ In Vorbereitung.