

## DIN EN ISO 11063



ICS 13.080.30

**Bodenbeschaffenheit –  
Verfahren zur direkten Extraktion von DNA aus Bodenproben  
(ISO 11063:2012);  
Deutsche Fassung EN ISO 11063:2013**

Soil quality –  
Method to directly extract DNA from soil samples (ISO 11063:2012);  
German version EN ISO 11063:2013

Qualité du sol –  
Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol (ISO 11063:2012);  
Version allemande EN ISO 11063:2013

Gesamtumfang 28 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

## Nationales Vorwort

Der Text von ISO 11063:2012 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 11063:2013 durch das Technische Komitee CEN/TC 345 „Charakterisierung von Böden“ übernommen, dessen Sekretariat vom NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Es ist erforderlich, bei den Arbeiten nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 10381-6      siehe      DIN ISO 10381-6

## Nationaler Anhang NA (informativ)

### Literaturhinweise

DIN ISO 10381-6, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden unter aeroben Bedingungen für die Beurteilung mikrobiologischer Prozesse sowie der Biomasse und der Diversität unter Laboratoriumsbedingungen*

Deutsche Fassung

Bodenbeschaffenheit - Verfahren zur direkten Extraktion von  
DNA aus Bodenproben (ISO 11063:2012)

Soil quality - Method to directly extract DNA from soil  
samples (ISO 11063:2012)

Qualité du sol - Méthode pour extraire directement l'ADN  
d'échantillons de sol (ISO 11063:2012)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 5. Februar 2013 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 Management-Zentrum des CEN-CENELEC 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, 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

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

## Inhalt

|                                                                                                                              | Seite     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Vorwort .....</b>                                                                                                         | <b>3</b>  |
| <b>Einleitung.....</b>                                                                                                       | <b>4</b>  |
| <b>1 Anwendungsbereich .....</b>                                                                                             | <b>5</b>  |
| <b>2 Normative Verweisungen .....</b>                                                                                        | <b>5</b>  |
| <b>3 Begriffe .....</b>                                                                                                      | <b>5</b>  |
| <b>4 Kurzbeschreibung .....</b>                                                                                              | <b>5</b>  |
| <b>5 Prüfmaterialien.....</b>                                                                                                | <b>6</b>  |
| 5.1 Boden.....                                                                                                               | 6         |
| 5.2 Chemikalien.....                                                                                                         | 6         |
| 5.3 Pufferlösungen und Reagenzien.....                                                                                       | 7         |
| <b>6 Geräte.....</b>                                                                                                         | <b>7</b>  |
| <b>7 Durchführung.....</b>                                                                                                   | <b>8</b>  |
| 7.1 Vorbereitung von Bodenproben.....                                                                                        | 8         |
| 7.2 Mechanische und chemische Lysis.....                                                                                     | 8         |
| 7.3 Proteinfällung.....                                                                                                      | 8         |
| 7.4 Fällen und Waschen von Nukleinsäuren.....                                                                                | 8         |
| 7.5 Aufbewahrung von Nukleinsäuren .....                                                                                     | 8         |
| <b>8 Abschätzung der Qualität und Quantität der Boden-DNA.....</b>                                                           | <b>8</b>  |
| 8.1 Qualität und Reinheit der Boden-DNA.....                                                                                 | 8         |
| 8.2 Quantität der Boden-DNA .....                                                                                            | 9         |
| <b>9 Validierung des Extraktionsverfahrens .....</b>                                                                         | <b>9</b>  |
| <b>10 Internationaler Ringversuch .....</b>                                                                                  | <b>9</b>  |
| <b>11 Prüfbericht.....</b>                                                                                                   | <b>9</b>  |
| <b>Anhang A (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung des Verfahrens zur Extraktion<br/>von Boden-DNA .....</b> | <b>10</b> |
| <b>Literaturhinweise .....</b>                                                                                               | <b>24</b> |

## **Vorwort**

Der Text von ISO 11063:2012 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 11063:2013 durch das Technische Komitee CEN/TC 345 „Charakterisierung von Böden“ übernommen, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2013, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2013 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

### **Anerkennungsnotiz**

Der Text von ISO 11063:2012 wurde vom CEN als EN ISO 11063:2013 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

## Einleitung

DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist ein lebensnotwendiger Bestandteil sämtlicher lebender Organismen, der die Enzyme kodiert, die für alle biologischen Aktivitäten verantwortlich sind. Durch die Untersuchung von DNA-Sequenzen aus DNA-Quellen unterschiedlicher Matrices mit molekularen Verfahren werden molekulare Marker erhalten, die zur genauen Unterscheidung und Identifizierung verschiedener Organismen (Bakterien, Archaea und Eukaryoten) verwendet werden können.

Bislang war die Entwicklung von Verfahren zur Kennzeichnung mikrobieller Indikatoren für die mikrobielle Bodenbeschaffenheit durch die „Unkultivierbarkeit“ vieler Mikroorganismen und fehlende Empfindlichkeit traditioneller mikrobiologischer Verfahren [16] eingeschränkt. Die jüngste Entwicklung einer Vielzahl von molekularbiologischen Verfahren, die hauptsächlich auf der Vervielfältigung von aus dem Boden extrahierten Nukleinsäuren beruhen, stellen eine angemessene Alternative zu den klassischen mikrobiologischen Verfahren auf der Grundlage von Kulturen dar und bieten einen einzigartigen Einblick in die Zusammensetzung, den Artenreichtum und die Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften [15], [18], [26], [27], [36]. Auf DNA basierende Verfahren sind gegenwärtig in der Bodenökologie gängige Verfahren und dienen als genotypische (= molekulargenetische) Marker für die Bestimmung der mikrobiellen Diversität.

Die Ergebnisse der molekularen Analysen von Lebensgemeinschaften und/oder Populationen von Bodenmikroorganismen stützen sich auf zwei Hauptparameter:

- a) die Extraktion von DNA, die repräsentativ für die Zusammensetzung der indigenen bakteriellen Lebensgemeinschaft ist;
- b) den Einfluss der PCR (PCR-Bias), z. B. die Wahl der Primer, die Konzentration der amplifizierten DNA, Fehler in der PCR oder sogar das für die Analyse gewählte Verfahren [23], [26], [38], [40]. In letzter Zeit wurden in einer Vielzahl von Studien neue Verfahren untersucht, um die Extraktion, Aufreinigung, Amplifikation und quantitative Bestimmung von DNA aus Böden zu verbessern [20].

Das Ziel dieser Internationalen Norm ist die Beschreibung des Verfahrens, das für die direkte Extraktion von DNA aus Bodenproben angewendet wird. Die Vergleichspräzision dieses Verfahrens für die Extraktion von Boden-DNA wurde in einem Internationalen Ringversuch (Anhang A) beurteilt. Die Vergleichspräzision dieses Extraktionsverfahrens für Boden-DNA wurde sowohl durch quantitative (q-PCR) als auch qualitative (RISA) Verfahren erfolgreich evaluiert.

## 1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur direkten Extraktion von DNA aus Bodenproben für die Analyse der allgemeinen Struktur und der Abundanz von Lebensgemeinschaften von Bodenbakterien mit Verfahrensweisen auf der Grundlage von PCR fest. Dieses Verfahren ist vorwiegend für landwirtschaftlich genutzte Böden und Waldböden vorgesehen. Dieses Verfahren kann möglicherweise für Böden mit hohem organischen Anteil (z. B. Torfböden) oder Böden, die stark mit organischen Verunreinigungen oder Schwermetallen belastet sind, geeignet sein.

Die direkte Extraktion von DNA aus Bodenproben bietet einen einzigartigen Einblick in den Artenreichtum und die Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften, was die Schlüsselp Parameter zur Abschätzung der Biodiversität der Bodenmikroflora und -fauna sind. Molekulare Verfahren auf der Grundlage der Amplifikation von Boden-DNA durch PCR (Polymerasekettenreaktion) stellen ein vielversprechendes Gebiet dar und können in naher Zukunft zur Entwicklung von Routinewerkzeugen beitragen, die die Abschätzung der Bodenbeschaffenheit ermöglichen.

Anwender dieser Norm sollten beachten, dass obwohl der Boden für die DNA-Extraktion sorgfältig gesiebt wird (2-mm-Sieb, Verfahren in 5.1 beschrieben), Pflanzenrückstände in den Bodenproben noch verbleiben können und damit Spuren von Pflanzen-DNA das Boden-Extrakt verunreinigen können.

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 10381-6, *Soil quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory*

## 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

### 3.1

#### **Boden-DNA**

aus Boden bewohnenden Mikroorganismen extrahierte DNA und von toten Mikroorganismen verbliebene DNA

## 4 Kurzbeschreibung

Die DNA wird unter Anwendung des folgenden Extraktionsverfahrens direkt aus 0,25 g Bodenproben extrahiert. Dieses Verfahren ermöglicht eine zuverlässige Analyse der allgemeinen Struktur von bakteriellen und archealen Lebensgemeinschaften und kann angepasst werden (Extraktion aus 1 g Bodenprobe), um die allgemeine Struktur von Pilzlebensgemeinschaften zu beurteilen [32]. Bodenproben, denen eine Extraktionspufferlösung hinzugefügt wurde, werden einer mechanischen und chemischen Lysis unterzogen. Der Lysis-Schritt, z. B. durch Mahlen mit Glasperlen, ist ein entscheidender Schritt, um auch die DNA von Mikroorganismen zu extrahieren, deren Lysis schwierig ist. Nach einer kurzen Zentrifugation werden die Restpartikel vom Boden entfernt und die Proteine mit Kaliumacetat ausgefällt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand gewonnen und die Nukleinsäuren werden mit eiskaltem Isopropanol ausgefällt. Nach der Zentrifugation wird das Nukleinsäurepellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und in sterilem destilliertem Wasser suspendiert. Die Qualität der DNA wird anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft und die Quantität der DNA mit einem Fluoreszenzspektrometer abgeschätzt. Ein schematischer Überblick über das Verfahren ist in Bild 1 dargestellt.

## 5 Prüfmateriellen

### 5.1 Boden

Die Bodenproben sollten entnommen und gesiebt (Maschenweite 2 mm) werden. Wenn die Proben nicht sofort bearbeitet werden, sollten sie für bis zu zwei Jahre bei  $-20\text{ °C}$  oder für bis zu 10 Jahre bei  $-80\text{ °C}$  oder in flüssigem Stickstoff ( $-180\text{ °C}$ ) nach ISO 10381-6 gelagert werden. Falls Bodenproben eingefroren werden, dürfen sie nur einmal aufgetaut werden. Einige dieser Lagerungsbedingungen werden derzeit geprüft.

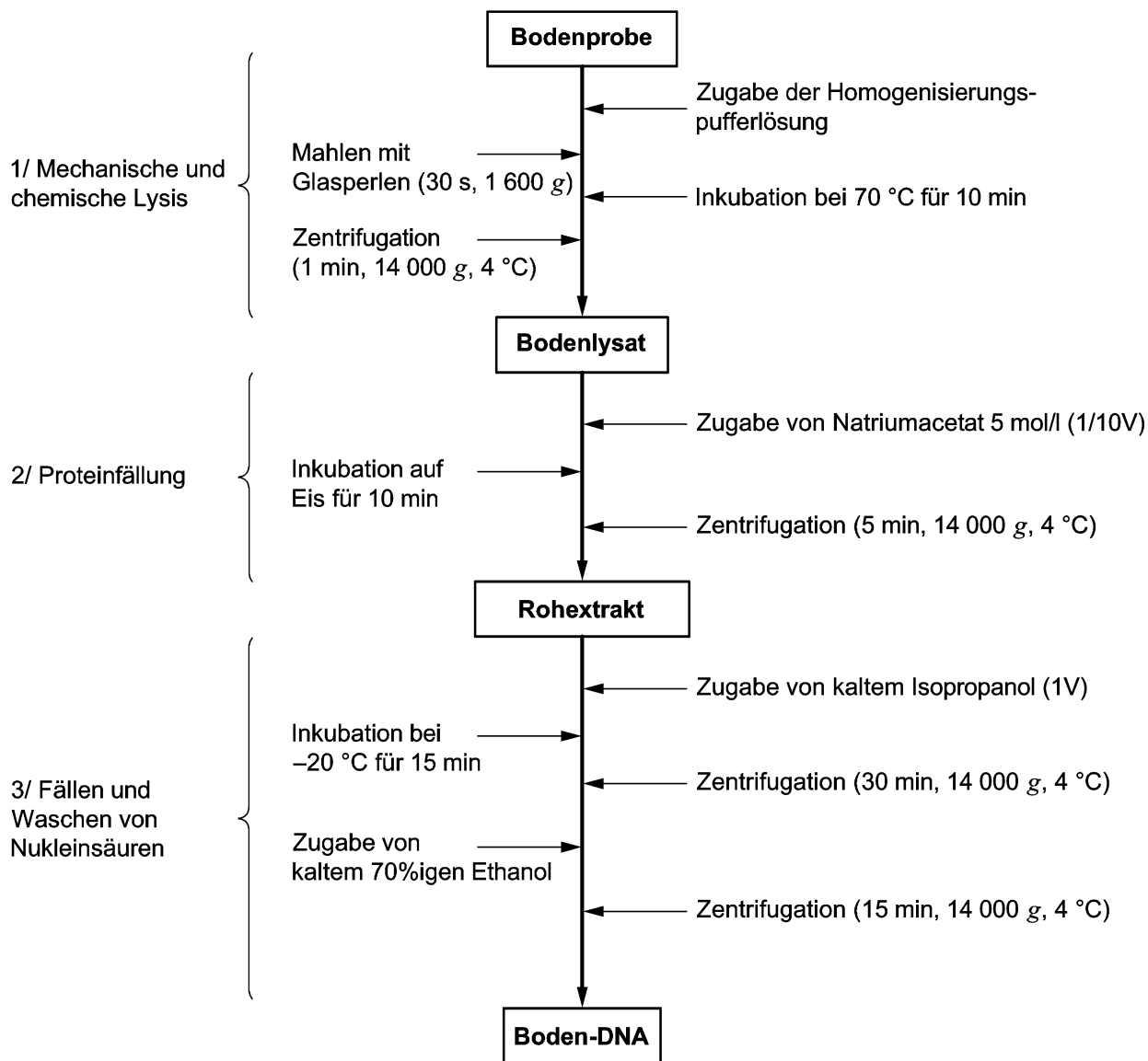


Bild 1 — Schematischer Überblick über das Verfahren zur Extraktion von Boden-DNA

### 5.2 Chemikalien

5.2.1 Tris[hydroxymethyl]aminomethan,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$  (CAS Nr 77-86-1).

5.2.2 Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA),  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (CAS Nr 6381-92-6).

5.2.3 Natriumchlorid,  $\text{NaCl}$  (CAS Nr 7647-14-5).

5.2.4 Natriumdodecylsulfat (SDS),  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$  (CAS Nr 151-21-3).

**5.2.5 Polyvinylpyrrolidon (PVP),**  $[C_6H_9NO]_n$  (CAS Nr 9003-39-8).

**5.2.6 Natriumacetat,**  $CH_3COONa$  (CAS Nr 6131-90-4).

**5.2.7 Essigsäure oder Eisessig,**  $CH_3COOH$  (CAS Nr 64-19-7).

**5.2.8 Isopropanol,**  $CH_3CHOHCH_3$  (CAS Nr 67-63-0).

**5.2.9 Ethanol,**  $CH_3CH_2OH$  (CAS Nr 64-17-5).

**5.2.10 Wasser mit molekularbiologischer Reinheit,**  $H_2O$ .

### 5.3 Pufferlösungen und Reagenzien

Für die Extraktion von Boden-DNA verwendete Pufferlösungen und Reagenzien (mit Ausnahme von interkalierenden Molekülen) werden sterilisiert (bei 120 °C für 20 min) und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Ethanol und Isopropanol werden bei –20 °C aufbewahrt.

**5.3.1 Tris-HCl, 1 mol/l,** 121,14 g Tris in 1 000 ml  $H_2O$ , mit 4 mol/l HCl auf einen pH-Wert von 8,0 einstellen.

**5.3.2 EDTA, 0,5 mol/l,** 168,10 g EDTA in 1 000 ml  $H_2O$ , mit NaOH (10 mol/l) auf einen pH-Wert von 8,0 einstellen.

**5.3.3 NaCl, 1 mol/l,** 58,44 g NaCl in 1 000 ml  $H_2O$ .

**5.3.4 PVP 40, 20%ig,** 200 g PVP in 1 000 ml  $H_2O$ .

**5.3.5 SDS, 20%ig,** 200 g SDS in 1 000 ml  $H_2O$ .

**5.3.6 Homogenisierungspufferlösung** (unmittelbar vor dem Gebrauch frisch hergestellt), 100 ml 1 mol/l Tris-HCl (pH-Wert 8,0), 200 ml 0,5 mol/l EDTA (pH-Wert 8,0), 100 ml 1 mol/l NaCl, 50 ml 20%iges PVP 40, 100 ml 20%iges SDS in 450 ml  $H_2O$ .

**5.3.7 Natriumacetat, 5 mol/l (pH-Wert 5,5),** 410,15 g  $CH_3COONa$  in 800 ml  $H_2O$ . 120 ml Essigsäure hinzugeben und mit Eisessig auf einen pH-Wert von 5,5 einstellen. Fülle auf 1 000 ml mit Wasser auf.

**5.3.8 Ethanol, 70%ig,** 700 ml reines Ethanol in 300 ml  $H_2O$ .

**5.3.9 TE-Pufferlösung,** pH-Wert 8,0, 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA.

**5.3.10 Glasperlen** (106  $\mu m$ ).

**5.3.11 Glasperlen** (2 mm).

**5.3.12 Ethidiumbromid,** 5 mg Ethidiumbromid in 1 000 ml  $H_2O$ .

**5.3.13 Fluoreszierender Nukleinsäure-Strang,** Anregung bei 480 nm und Emission bei 520 nm.

**5.3.14 Reine DNA** (100 ng je  $\mu l$ ).

**5.3.15 TBE-Pufferlösung  $\times 10$ ,** pH-Wert 8,0, 108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0) in 1 000 ml  $H_2O$ .

**5.3.16 TBE-Pufferlösung  $\times 1$ ,** 100 ml TBE-Pufferlösung  $\times 10$  in 900 ml  $H_2O$ .

## 6 Geräte

Es ist die übliche Laborausrüstung, einschließlich Pipetten, Zentrifuge, Abzugsschrank, horizontales Elektrophoresesystem, sowie Folgendes zu verwenden.