

DIN EN 17477

ICS 13.020.55

Einsprüche bis 2020-03-10

Entwurf

**Algen und Algenprodukte –
Identifizierung der Biomasse von Mikroalgen, Makroalgen, Cyanobakterien
und/oder Labyrinthulomycetes –
Erkennung und Identifizierung mit morphologischen und/oder
molekularen Methoden;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17477:2020**

Algae and algae products –
Identification of the biomass of micro-algae, macro-algae, cyanobacteria and/or
Labyrinthulomycetes –
Detection and identification with morphological and/or molecular methods;
German and English version prEN 17477:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-01-10 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 nagus@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 Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 54 Seiten

DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17477:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 172-00-16 AA „Algen und Algenprodukte“ im DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS) verantwortlich.

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.

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 24276:2013-10

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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 24276:2013-10, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO 24276:2006 + Amd 1:2013); Deutsche Fassung EN ISO 24276:2006 + A1:2013*

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 Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

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

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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	5
4 Abkürzungen	7
5 Reagenzien	8
6 Gerät	9
7 Kurzbeschreibung	11
8 Durchführung	12
9 Morphologische Identifizierungsverfahren	14
10 Molekulare Identifizierungsverfahren	15
11 Untersuchungsbericht	19
Anhang A (informativ) Beispiele für universell verfügbare Primer	20
A.1 Prokaryotische Primer, spezifisch für Cyanobakterien	20
A.1.1 PCR — 16S-rDNS-Amplifikation	20
A.1.2 Sequenzierung	20
A.2 Eukaryotische Primer, allgemeinerer Natur (Mikroalgen; Labyrinthulidae; Seetange)	20
A.2.1 PCR — 18S-rDNS-Amplifikation	20
A.2.2 PCR-Primer für das COX1-Gen	20
A.2.3 PCR-Primer für das tufA-Gen	21
A.2.4 PCR-Primer für rbcL	21
Anhang B (informativ) Wissenschaftliche Literatur, die für die Identifizierung verwendet werden darf	22
Anhang C (informativ) Beispiele für DNS-Extraktionsverfahren für die PCR	24
Anhang D (informativ) Beispiel für einen üblichen Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
Literaturhinweise	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17477:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben.

1 Anwendungsbereich

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

Die in diesem Dokument dargelegten morphologischen Verfahren gelten 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 gelten 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 Beobachtung;
 - lichtmikroskopische Beobachtung;
- molekulare Verfahren der Sequenzierung und des Sequenzvergleichs („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.

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*

FprEN 17399:2019, *Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte — Begriffe*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach FprEN 17399:2019, ISO 24276 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 <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://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.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Abkürzung DNS steht für Desoxyribonukleinsäure.

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: Der größte Anteil der Sequenzierungsarbeiten bezüglich des 18S-rDNS-Gens entfällt auf Eukaryoten.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Abkürzung DNS steht für Desoxyribonukleinsäure.

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

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: Er approximiert Alignments direkt so, dass ein Maß für die lokale Ähnlichkeit, der Wert für das Signalkontrast mit maximalem Signal (MST-Score), optimiert wird.

3.5

Blasting von Sequenzen

Sequenzvergleich gegen häufig verwendete Gensequenz-Datenbanken

3.7

COX1-Gensequenzierung

Prozess zur Bestimmung der Nukleotidsequenz im COX1-Gen

3.8

Nachweis

Auffinden des Zielorganismus/-mikroorganismus mittels eines speziellen Verfahrens

3.9

DNS-Extraktion

Trennung der DNS von den anderen Bestandteilen in einer Untersuchungsprobe

Anmerkung 1 zum Begriff: In Anlehnung an ISO 24276:2006

3.10

DNS-Sequenz

Abfolge der Nukleotide in einem Desoxyribonukleinsäure-Molekül

3.12

GenBank

umfangreiche öffentlich zugängliche Datenbank von genetischen Referenz-Sequenzen

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

3.13

ITS-Sequenzierung

Prozess zur Bestimmung der Nukleotidsequenz des intern transkribierten Spacers (ITS)

3.14

makroskopische Beobachtung

Identifizierung mit bloßem Auge auf der Basis von taxonomischen Schlüsseln

3.15

mikroskopische Beobachtung

Identifizierung durch Vergrößerung mithilfe von Vergrößerungsgläsern, Binokularen oder Mikroskopen auf der Basis von taxonomischen Schlüsseln

3.16

molekulares Identifizierungsverfahren

Satz an Instrumenten, der auf dem Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der aus einem Organismus/Mikroorganismus mittels des PCR-(Polymerase-Kettenreaktion-)basierten Verfahrens isolierten DNS mit öffentlich zugänglichen, dokumentierten Daten bekannter (Mikro-)Organismen beruht

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Daten, die bei Anwendung der jeweiligen nachgeordneten Instrumente wie der Gensequenzierung erhalten werden, können mit den Sequenzen bekannter Arten verglichen werden, die über öffentliche Datenbanken (siehe 3.4) zugänglich sind.

Anmerkung 2 zum Begriff: Diese Verfahren ermöglichen den Nachweis von geringen DNS-Konzentrationen nicht lebensfähiger Organismen.

3.17

morphologisches Identifizierungsverfahren

Identifizierungsverfahren, das auf morphologischen Merkmalen beruht

3.18

positive PCR-Kontrolle

bekannte positive (identifizierte) Probe, die die DNS-Sequenz des untersuchten (Mikro-)Organismus repräsentiert

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Kontrolle wird zum Nachweis eingesetzt, dass die PCR-Reagenzien ihre beabsichtigte Funktion haben.

Anmerkung 2 zum Begriff: In Anlehnung an ISO 24276:2006.

3.19

rbcl-DNS-Sequenzierung

Prozess zur Bestimmung der Sequenz der Nukleotide (A, T, C und G) des Gens, das für die große Untereinheit des Proteins Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) codiert

3.20

Sanger-Sequenzierung

zyklisches Sequenzierungsverfahren, bei dem fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide verwendet werden

3.21

Stammidentifizierung

Bestimmung der Gattung und vorzugsweise auch der Art eines Stamms

3.23

tufA-Gensequenzierung

Prozess zur Bestimmung der Nukleotidsequenz im tufA-Gen

4 Abkürzungen

A	Adenosin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Cytosin
COX1	Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit 1
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ENA	European Nucleotide Archive
G	Guanin
GenBank	GenBank am National Centre for Biotechnology Information (NCBI)
ITS	intern transkribierter Spacer
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (en: polymerase chain reaction)
rbcl	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
rDNS	ribosomale DNS
RNS	Ribonukleinsäure
T	Thymin
tufA	Elongationsfaktor TU

5 Reagenzien

5.1 Reagenzien für morphologische Verfahren

5.1.1 Allgemeines

Bei der Untersuchung von Biomasse zur morphologischen Identifizierung müssen die folgenden Reagenzien verwendet werden, um sicherzustellen, dass eine bestimmte Menge an Salzen im Reagenz vorliegt, sodass bei einer Untersuchung der Probe das Platzen oder Schrumpfen von Zellen verhindert wird. Destilliertes Wasser darf nicht verwendet werden.

5.1.2 Leitungswasser

Normales Leitungswasser enthält üblicherweise eine ausreichende Menge an Salzen, um das Platzen von Zellen zu vermeiden, und kann zur Vorbereitung einer Probe für die mikroskopische Beobachtung verwendet werden.

5.1.3 Kulturmedium

Das zum Kultivieren des zu identifizierenden Organismus verwendete Kulturmedium enthält eine ausreichende Menge an Salzen, um das Platzen von Zellen zu vermeiden, und kann zur Vorbereitung einer Probe für die mikroskopische Beobachtung verwendet werden.

5.1.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (en: phosphate-buffered saline, PBS)

Bei PBS handelt es sich um eine im Handel erhältliche wässrige Salzlösung, die eine ausreichende Menge an Salzen enthält und daher zur Vorbereitung einer Probe für die mikroskopische Beobachtung verwendet werden kann.

5.2 Reagenzien für molekulare Verfahren

5.2.1 Thermostabile DNS-Polymerase

Thermostabile DNS-Polymerase ist ein kritisches Reagens bei der Replikation der Ziel-DNS. Es handelt sich dabei um ein Enzym, das aus einem thermophilen Bakterium gewonnen wird und bei einer hohen Temperatur aktiv ist. Es wird bei der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Thermostabile DNS-Polymerasen sind im Handel erhältlich und sollten nach den Anweisungen im Protokoll des jeweiligen Herstellers verwendet werden.

5.2.2 PCR-Reaktionspuffer

PCR-Reaktionspuffer werden im Allgemeinen zusammen mit der thermostabilen DNS-Polymerase (5.2.1) verkauft. PCR-Reaktionspuffer können $MgCl_2$ enthalten oder sie können mit einer separaten $MgCl_2$ -Lösung geliefert werden.

5.2.3 Desoxynukleosid-Triphosphat-Mix (dNTPs)

Ein Desoxynukleosid-Triphosphat-Mix (dNTPs) besteht aus den vier grundlegenden Nukleotiden — dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Sie sind die Bausteine für die neuen DNS-Stränge. Für einen optimalen Baseneinbau werden diese vier Nukleotide üblicherweise in äquimolaren Mengen zur PCR-Reaktion gegeben. dNTPs sind im Handel erhältlich.

5.2.4 Primer

Ein Primer ist ein synthetisches DNS-Oligonukleotid aus etwa 15 bis 30 Basen. Sie sind so ausgelegt, dass sie (über die Sequenzkomplementarität) an die flankierenden Sequenzen neben der untersuchten Region in der Template-DNS binden. Primer werden sowohl bei der PCR als auch bei Sequenzierungsreaktionen eingesetzt. Beispielsweise verlängert bei der PCR-Reaktion die DNS-Polymerase die Primer von deren 3'-Enden aus. Daher müssen die Bindungsstellen der Primer eindeutig für die benachbarte Region der Zielsequenz sein, und sie dürfen nur minimale Homologie zu anderen Sequenzen der eingesetzten DNS aufweisen, um eine spezifische Amplifikation der beabsichtigten Zielsequenz sicherzustellen.

Empfehlungen hinsichtlich der Primer für PCR und Sequenzierung finden sich in Anhang A.

5.2.5 Agarose-Gel

Es wird ein Agarose-Gel von geeigneter Konzentration verwendet, z. B. mit 1 % bis 2 % (Masse/Volumen).

5.2.6 DNS-Leiter

Als DNS-Leiter wird der Molekulargewichtsmarker bezeichnet. Es handelt sich dabei um ein Gemisch von DNS-Standardmolekülen mit bekannter Länge, die dazu dienen, die ungefähre Größe eines Moleküls, beispielsweise eines PCR-Produkts anhand der Laufstrecke in einem Gel bei der Elektrophorese zu bestimmen. DNS-Leitern sind kommerziell erhältlich.

6 Gerät

6.1 Allgemeines

Im Laboratorium müssen ordnungsgemäß, nach den Anweisungen des jeweiligen Herstellers gewartete Ausrüstungen verwendet werden; außerdem sollten die in EN ISO/IEC 17025 dargelegten Anforderungen eingehalten werden. Zusätzlich zu der üblichen Laborausrüstung werden spezifische Geräte in den einzelnen Normen beschrieben.

Gegebenenfalls sollte mit Ausrüstungen, deren Leistung die gewonnenen Daten beeinflussen könnte, regelmäßig eine Kalibrierung durchgeführt werden. Neben laborüblichen Ausrüstungen sind die nachfolgend beschriebenen Ausrüstungen erforderlich.

6.2 Geräte für morphologische Identifizierungsverfahren

6.2.1 Schwach vergrößerndes optisches System, beispielsweise ein Vergrößerungsglas oder ein Präpariermikroskop

Für die morphologische Untersuchung von Details, die für die Identifizierung von Makroalgen oder Geweben notwendig sind, kann ein im Handel erhältliches Vergrößerungsglas oder Präpariermikroskop ausreichend sein. Diese Geräte sind mit Linsen ausgestattet, die Vergrößerungsfaktoren zwischen 0,65× und 5× haben. Im Falle eines Präpariermikroskops wird diese Angabe durch den Vergrößerungsfaktor des Okulars (üblicherweise 10×) oder der Linse im Strahlengang der Kamera (häufig ebenfalls 10×) ergänzt. Daraus ergibt sich eine Gesamtvergrößerung zwischen 6,5× und 50×. Die Verwendung erfolgt nach den Anweisungen im Gerätehandbuch.

6.2.2 Lichtmikroskop

Für die morphologische Untersuchung der Details von mikroskopisch kleinen Organismen kann ein im Handel erhältliches Lichtmikroskop verwendet werden, das optional mit verschiedenen Einrichtungen zur Kontrastverstärkung und/oder Fluoreszenzerzeugung ausgestattet ist. Derartige Lichtmikroskope haben üblicherweise Objektivlinsen mit Vergrößerungsfaktoren zwischen 4× und 100×; diese Angabe wird durch

den Vergrößerungsfaktor des Okulars (üblicherweise 10×) oder der Linse im Strahlengang der Kamera (häufig ebenfalls 10×) ergänzt. Daraus ergibt sich eine Gesamtvergrößerung zwischen 40× und 1 000×. Optionale Einrichtungen zur Kontrastverstärkung, wie zum Beispiel Phasenkontrast oder Differentialinterferenzkontrast (DIC, auch als Nomarski-Kontrast bezeichnet) oder auch Dunkelfeldmodus, können je nach der zu untersuchenden taxonomischen Gruppe nützlich sein. Die Verwendung erfolgt nach den Anweisungen im Gerätehandbuch.

6.2.3 Wissenschaftliche Literatur zur Taxonomie

Die wissenschaftliche Literatur wird entsprechend dem zu untersuchenden Organismus ausgewählt. Eine Auswahl findet sich in Anhang B. Die dort aufgeführte Literatur kann einen dichotomen oder polytomen Schlüssel enthalten, der den Anwender durch den Identifizierungsprozess führt. Zusätzlich könnten eine Zeichnung oder Fotos dazu beitragen, das korrekte Taxon zu identifizieren.

6.2.4 Objektträger für die Mikroskopie

Objektträger für die Mikroskopie bestehen aus Glas und sind passend für den Objektstisch (x-y-Tisch) eines Mikroskops in den typischen Maßen 76 mm × 26 mm (Länge × Breite) und einer Dicke von 1 mm im Handel erhältlich. Die Glasqualität ist so optimiert, dass sie den optischen Strahlengang und die Objektivlinsen nicht stört. Vor Gebrauch sollten die Objektträger so gereinigt werden, dass es nicht zu einer Interferenz von Partikeln mit den mikroskopischen Details des zu untersuchenden Organismus kommen kann.

6.2.5 Deckgläser für die Mikroskopie

Deckgläser für die Mikroskopie bestehen aus Glas und sind in verschiedenen Größen und Formen (rund, quadratisch, rechteckig) im Handel erhältlich. Für allgemeine Anwendungen werden quadratische Deckgläser mit den Maßen 18 mm × 18 mm und einer Dicke von 0,13 mm bis 0,16 mm empfohlen. Die Dicke des Deckglases ist wichtig, wenn stärkere Vergrößerungen angewendet werden, beispielsweise bei Linsen mit einem Vergrößerungsfaktor von > 50×; es handelt sich dabei meist um Immersionsobjektive, die üblicherweise zusammen mit Immersionsöl benutzt werden. Die Dicke des Deckglases ist so optimiert, dass der Strahlengang eine optimale Sicht auf den untersuchten Organismus ermöglicht.

6.3 Geräte für molekulare Identifizierungsverfahren

6.3.1 Thermocycler

Ein Thermocycler ist ein Gerät, das zur Amplifikation von DNS- oder RNS-Proben durch die Polymerase-Kettenreaktion verwendet wird. Der Thermocycler wird so programmiert, dass die Temperatur der in einen Heizblock eingesetzten Proben erhöht und gesenkt wird, sodass die Denaturierung und erneute Hybridisierung der Proben mit verschiedenen Reagenzien ermöglicht wird. Die amplifizierten (vervielfältigten) genetischen Produkte können in vielen nachfolgenden Anwendungen wie Klonierung, Sequenzierung, Expressionsanalyse und Genotypisierung eingesetzt werden.

6.3.2 Gerät für die Gelelektrophorese

Ein Gelelektrophorese-Gerät ist ein Instrument, das zur Trennung der Komponenten von Proben, die Makromoleküle wie Nukleinsäure (DNS, RNS) und Proteine enthalten. Zur Durchführung werden die Proben an einem Ende des Elektrophoresegeles in kleinen Vertiefungen eingebracht. Ein PCR-Reaktionspuffer (5.2.2) liefert die Ionen zur Unterstützung des Stromflusses. Eine elektrische Stromquelle wird angeschlossen und zur elektrophoretischen Trennung über eine bestimmte Zeit eingeschaltet. Die Verwendung erfolgt nach den Anweisungen im Handbuch des jeweiligen Geräts oder Systems zur Geldokumentation.

6.3.3 DNS-Sequenziergerät

Ein DNS-Sequenziergerät ist ein Instrument, das zur Bestimmung der Abfolge der vier Basen (Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin) in einem DNS-Molekül verwendet wird. Als Ergebnis wird in Textform ein sogenannter „Read“ (eine Sequenz) ausgegeben. Einige DNS-Sequenziergeräte können als optische Instrumente angesehen werden, da sie die Lichtsignale, die von den an den Nukleotiden gebundenen Fluorochromen ausgehen, auswerten. Die Verwendung erfolgt nach den Anweisungen im Gerätehandbuch.

6.3.4 PCR-Gefäße

6.3.5 DNS-freie Pipette

6.3.6 Sterilfilter-Pipettenspitzen

7 Kurzbeschreibung

7.1 Allgemeines

Die Auswahl des Identifizierungsverfahrens richtet sich nach der Art des Materials und dem zu bestimmenden Ziel-(Mikro-)Organismus (Bild 1).

7.2 Morphologische Verfahren

Morphologische Merkmale des gesamten Thallus (bei Makroalgen), von Filamenten und/oder einzelnen Zellen (bei Mikroalgen, Cyanobakterien und Labyrinthulomycetes) werden mittels Beobachtung mit bloßem Auge oder vergrößernden optischen Geräten bestimmt. Alle bei der Charakterisierung der morphologischen Merkmale erhaltenen Daten werden mit den Daten in der wissenschaftlichen Literatur (6.2.3) verglichen. Oftmals kann mithilfe von Single-Access- oder Multi-Access-Schlüsseln (dichotomen oder polytomen Schlüsseln) die korrekte Identität eines Taxons identifiziert werden.

7.3 Molekulare Verfahren

Die DNS wird aus der Biomasse durch Anwendung eines geeigneten Verfahrens extrahiert. Erwähnenswert ist, dass bei einigen Algen wie Krustenalgen und freilebenden Korallenalgen vor der DNS-Extraktion gegebenenfalls ein Vorbehandlungsschritt erforderlich ist, bei dem die Oberfläche des Thallus zermahlen wird (z. B. mit einem elektrischen Bohrer).

Durch die PCR wird das 16S-rDNS-, 18S-rDNS-, ITS-, *cox1*-, *tufA*- oder *rbcL*-Gen in voller Länge oder in Teilen amplifiziert. Die PCR-Produkte können entweder kloniert oder direkt für die Sanger-Sequenzierung verwendet werden. Das erstgenannte Verfahren umfasst die Schritte Klonierung (Transformation, Inkubation der Bakterien) und DNS-Isolierung, um die Template-DNS für die Sequenzierung vorzubereiten. Die Nukleotidsequenz des PCR-Produkts wird dann mittels eines geeigneten DNS-Sequenzierungsverfahrens (z. B. der Sequenzierung nach Sanger) bestimmt.

Die Sequenz wird durch Vergleich der Referenz-Sequenz in Datenbanken evaluiert, um so die Zuordnung zu einer Art oder einer Gattung entsprechend dem Grad der Identität mit der Referenz-Sequenz der infrage stehenden Gattung bzw. Art vornehmen zu können. Eine Identifizierung von Makroalgen mittels PCR bis auf die Ebene der Art ist unter Umständen nicht immer möglich. In einigen Fällen ist die genetische Identifizierung bis zur Gattungsebene gegebenenfalls ausreichend.

8 Durchführung

8.1 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien

Hinsichtlich allgemeiner Laboranforderungen muss ISO 24276 angewendet werden.

8.2 Auswahl der Verfahren

Es können mehrere Verfahren zur Identifizierung eines Stammes von Mikroalgen, Makroalgen, Cyanobakterien und Labyrinthulomycetes oder der Biomasse dieser Organismen angewendet werden. Das geeignete Verfahren wird entsprechend dem Diagramm in Bild 1 ausgewählt.

Dieses Dokument ist üblicherweise ungeeignet für die Analyse von stark verarbeiteter Biomasse mit hochgradig abgebauter DNS, bei der die Längen der Fragmente für die Amplifikation der Targets nicht ausreichend sind, und bei der morphologische Merkmale nicht beurteilt werden können.

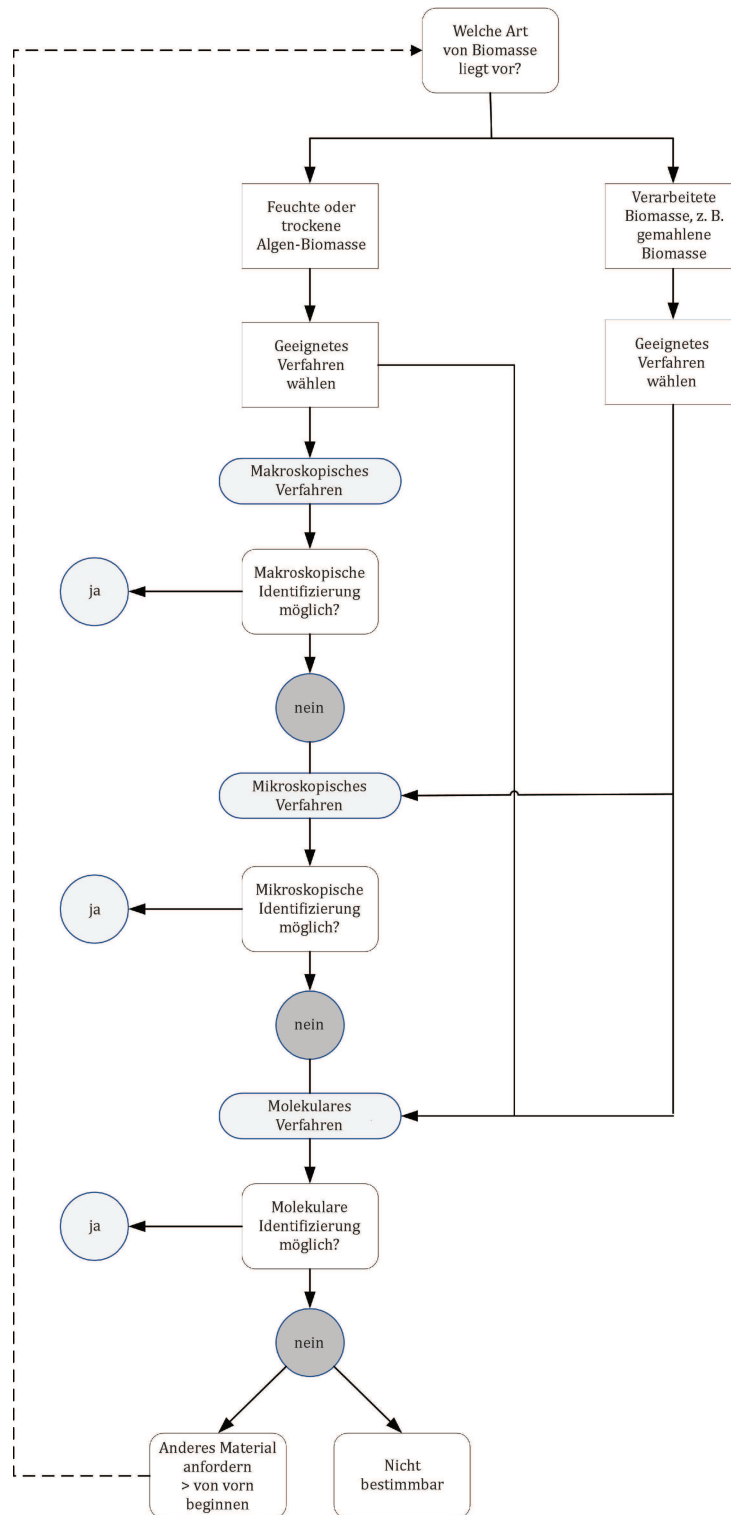


Bild 1 — Auswahl der Verfahren

9 Morphologische Identifizierungsverfahren

9.1 Allgemeines

Ein einfaches, kostengünstiges und schnelles Verfahren zur Identifizierung von Makro- und Mikroalgen, Cyanobakterien und Labyrinthulomycetes beruht auf den morphologischen Merkmalen, die in der wissenschaftlichen Literatur (6.2.3) zur Taxonomie der betreffenden Art beschrieben sind. Dieses Verfahren kann am besten auf feuchte (frische) Biomasse angewendet werden, im Falle von Makroalgen jedoch auch auf getrocknete Biomasse. Letztere darf auch in Leitungswasser (5.1.2), in einem Kulturmedium (5.1.3) oder in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (5.1.4) wieder angefeuchtet werden, um ein geeignetes Präparat zu erhalten. Destilliertes Wasser wird nicht verwendet, da dies eine unnatürliche Deformation oder ein Platzen von Zellen zur Folge haben könnte. Die Daten, die aus der Beobachtung der zur Identifizierung erforderlichen morphologischen Merkmale gewonnen werden, variieren stark zwischen den verschiedenen taxonomischen Gruppen der Organismen.

Die im Detail zu charakterisierenden Merkmale können sich in Abhängigkeit vom Taxon auf die gesamte Morphologie (z. B. die Form) oder spezielle Eigenschaften beziehen. Eine Auswahl der wissenschaftlichen Literatur (6.2.3), die zur Identifizierung verwendet werden darf, findet sich in Anhang B.

Je nach den in den Identifizierungsschlüsseln abgefragten Eigenschaften und der verfügbaren Biomasse wird entweder die makroskopische oder die mikroskopische Beobachtung angewendet oder beide. Die Verwendung von positiven Kontrollen und/oder Zeichnungen oder Fotos des Zielorganismus aus der wissenschaftlichen Literatur (6.2.3) zum Vergleich mit dem untersuchten Organismus kann für die auf morphologischen Merkmalen basierende Identifizierung hilfreich sein.

9.2 Makroskopische Beobachtung mit bloßem Auge oder einem Vergrößerungsglas

Im Falle von Makroalgen oder filamentösen Mikroalgen kann die Beobachtung mit bloßem Auge oder mit Verwendung eines schwach vergrößernden optischen Systems (6.2.1), beispielsweise mit einer Handlupe oder einem Präpariermikroskop, für die Identifizierung ausreichend sein. Solche Systeme haben üblicherweise Vergrößerungsfaktoren von unter 100:1.

9.3 Lichtmikroskopie

9.3.1 Allgemeines

Bei der lichtmikroskopischen Beobachtung dienen die Zellform und -größe und weitere in der spezifischen wissenschaftlichen Literatur (6.2.3) zur Taxonomie dargestellten Merkmale dazu, Seetange und Mikroorganismen zu identifizieren. Wenn Merkmale einzelner Zellen und von Zellorganellen für die Identifizierung notwendig sind, sind aufrechte Lichtmikroskope (6.2.2) für die Beobachtung erforderlich. Diese Systeme haben üblicherweise Vergrößerungsfaktoren von über 100:1.

9.3.2 Färbung

Falls relevant, werden die Zellen vor oder nach der Vorbereitung der mikroskopischen Objektträger (6.2.4) mit spezifischen Farbstoffen behandelt. Beispiele dafür sind die Lugolsche Iodlösung (Iod-Kaliumiodid-Lösung), z. B. zum Anfärben von Stärke oder zur besseren Erkennbarkeit des Zellkerns, oder Methylblau (Methylthioniniumchlorid), wodurch ebenfalls der Zellkern besser erkennbar wird. Dies kann von Nutzen sein, um spezifische Zellorganellen oder Metaboliten in der Zelle sichtbar zu machen, wenn in dem Bestimmungsschlüssel danach gefragt wird. Diese Farbstoffe können entweder im üblichen lichtmikroskopischen Modus oder, bei Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Im letzteren Fall muss das Mikroskop mit einer speziellen UV-emittierenden Lichtquelle, speziellen Filtersystemen und Strahlengang-Optik ausgestattet sein.

9.3.3 Vorbereitung von mikroskopischen Objektträgern

Ein Aliquot der feuchten oder trockenen Zellen des untersuchten Organismus wird in Leitungswasser (5.1.2), in einem Kulturmedium (5.1.3) oder in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (5.1.4) suspendiert. Destilliertes Wasser wird nicht verwendet, da dies eine unnatürliche Deformation oder ein Platzen von Zellen aufgrund von Osmose zur Folge haben könnte. Ein Tröpfchen dieser Suspension wird auf eine Seite des Objektträgers (6.2.4) aufgetragen und mit einem mikroskopischen Deckglas bedeckt (6.2.5). Es wird sichergestellt, dass keine Luftblasen zwischen Deckglas und Objektträger eingeschlossen werden, da dies die mikroskopische Beobachtung erschweren kann. Dazu wird das Deckglas zunächst schräg mit einer Seite auf das Tröpfchen mit dem Organismus aufgesetzt und dann langsam vollständig auf das Präparat abgesenkt.

9.3.4 Mikroskopische Beobachtung

Der vorbereitete Objektträger (6.2.4) wird auf den Objektisch (x-y-Tisch) eines aufrechten Lichtmikroskops (6.2.2) gelegt und entsprechend den Anweisungen im Mikroskop-Handbuch fixiert. Nach Einschalten der Lichtquelle wird durch Drehen des Objektivrevolvers ein Objektiv mit geeigneter Vergrößerung in den Strahlengang gebracht. Es wird bis Erreichen eines scharfen Bildes auf den Teil der Zelle oder das Zellorganell fokussiert, der bzw. das zur Bestimmung des Merkmals, nach dem im Bestimmungsschlüssel gefragt wird, erforderlich ist. Es wird in der Hellfeld- oder einer anderen in der Mikroskop-Konfiguration verfügbaren kontrastierenden Option, beispielsweise Phasenkontrast oder Differentialinterferenzkontrast (Nomarski-Kontrast) beobachtet, falls notwendig. Jeder Betrachtungsmodus kann für sich nützlich sein, um verschiedene morphologische Details der Zelle oder Zellorganellen sichtbar zu machen, die nach den in der wissenschaftlichen Literatur (6.2.3) erwähnten Schlüsseln zur Identifizierung der Taxa (Single-Access- oder Multi-Access-Schlüssel mit dichotomen oder polytomen Antwortalternativen) erforderlich sind.

9.3.5 Identifizierung mithilfe von Schlüsseln

Jeder Schritt des Identifizierungsschlüssels wird durch Beobachten des fraglichen Thallus-, Zell- oder Organellmerkmals vollzogen. An jeder Verzweigung des Schlüssels muss eine Frage beantwortet werden, sodass der Anwender Schritt für Schritt durch den Schlüssel geführt wird. Bei bestehender Unsicherheit wird zunächst an einem der Zweige fortgefahren, bis entweder eine eindeutige Identifizierung erfolgt oder, falls dieser Zweig zur Zuordnung der untersuchten Organismen zu einem zweifellos falschen Taxon führt, zurückgegangen bis zur letzten Verzweigung, um dann die andere Option zu probieren. Zeichnungen und Bilder jeder Art am Ende eines Bestimmungsschlüssels sind eine zusätzliche Hilfe, um schlusszufolgern, ob der korrekte Artnamen identifiziert worden ist. Auch der Vergleich mit Positivkontrollen kann hilfreich sein. Eine Auswahl an wissenschaftlicher Literatur (6.2.3) mit Schlüsseln, die zur Identifizierung genutzt werden können, ist in Anhang B aufgeführt. Falls dieses morphologische Identifizierungsverfahren nicht zum Erfolg führt, kann die Anwendung des molekularen Identifizierungsverfahrens erforderlich werden.

10 Molekulare Identifizierungsverfahren

10.1 DNS-Extraktion

Das Grundprinzip der DNS-Extraktion besteht darin, die in der Matrix vorhandene DNS herauszulösen. Verfahren zur DNS-Extraktion und/oder -Aufreinigung sind in Anhang C beschrieben. Alternativ können im Handel erhältliche Kits für die Extraktion und Aufreinigung von DNS verwendet werden.