

DIN EN 17805

ICS 13.060.70

Einsprüche bis 2022-02-10

Entwurf**Wasserprobenahme zum Nachweis aquatischer Umwelt-DNA;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17805:2021**

Water sampling for capture of microbial environmental DNA in aquatic environments;
German and English version prEN 17805:2021

Techniques de prélèvement d'eau en vue de l'analyse de l'ADN environnemental dans les
milieux aquatiques;
Version allemande et anglaise prEN 17805:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-12-10 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 naw@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 Wasserwesen (NAW), 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 33 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17805:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung (CEN/TC 230, ISO/TC 147)“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 7027-2:2019 siehe DIN EN ISO 7027-2:2019-06

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 EN ISO 7027-2:2019-06, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Trübung — Teil 2: Semi-quantitative Verfahren zur Beurteilung der Lichtdurchlässigkeit (ISO 7027-2:2019); Deutsche Fassung EN ISO 7027-2:2019*

<i>Titel de:</i>	Wasserprobenahme zum Nachweis aquatischer Umwelt-DNA
<i>Titel en:</i>	Water sampling for capture of microbial environmental DNA in aquatic environments
<i>Titel fr:</i>	Techniques de prélèvement d'eau en vue de l'analyse de l'ADN environnemental dans les milieux aquatiques

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Begriffe	5
4 Grundlagen	7
5 Allgemeines Verfahren	8
5.1 Allgemein.....	8
5.2 Probenahme.....	8
5.3 Vorbereitung der Ausrüstung vor der Feldarbeit	8
5.4 Auffangen des Wassers und Gewinnung der eDNA.....	8
5.5 Konservierung der Probe	9
6 Ausrüstung.....	9
7 Konservierungslösungen.....	11
7.1 Allgemeines	11
7.2 Beispiele für Konservierungslösungen	11
8 Empfohlene Schlüsselinformationen zur Aufzeichnung der Vorplanung	12
8.1 Allgemeines	12
8.2 Identität und Merkmale der Probe.....	12
8.3 Probenahmestelle	12
8.4 Probenahmebedingungen.....	13
8.5 Probenahme.....	13
9 Vermeidung von Probenkontaminationen.....	13
9.1 Allgemeines	13
9.2 Kontamination durch Ausrüstung	13
9.3 Kontamination durch Probennehmer	14
9.4 Verfahren zur Dekontamination der Probenahmeausrüstung	14
9.5 Materialien und Geräte, die in direktem Kontakt mit der Wasserprobe stehen.....	14
9.6 Materialien und Geräte, die nicht in direktem Kontakt mit der Wasserprobe stehen	15
Literaturhinweise	16

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17805:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Die Überwachung von Organismen ist der Schlüssel zur Beurteilung des Zustands aquatischer Ökosysteme und wird von nationalen und internationalen Rechtsvorschriften wie der Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union (2000/60/EG) gefordert. Es wurde eine Reihe von Methoden zur Überwachung von Organismen in der aquatischen Umwelt beschrieben, die zu einer breiten Palette von Europäischen Normen geführt haben (z. B. EN 14011:2003, EN 14757:2005, EN 15460:2007). Diese Ansätze erfordern jedoch das Einfangen und/oder Sammeln der interessierenden Organismen, was ein mühsamer und zeitaufwändiger Prozess sein kann.

Die Möglichkeit, das Vorhandensein von Organismen nachzuweisen und/oder die relative Häufigkeit (z. B. [1]) in aquatischen Umgebungen durch die Analyse von Umwelt-DNA (eDNA) zu quantifizieren, bietet ein neuartiges Mittel zur Überwachung der biologischen Vielfalt in einem breiten Spektrum von taxonomischen Gruppen, einschließlich Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren ([2][3]). Mit diesem Ansatz lässt sich die organismische Vielfalt untersuchen, ohne dass Organismen direkt isoliert und gefangen werden müssen, und es wird erwartet, dass er eine Schlüsselrolle für das künftige Biomonitoring spielt, das auf zeitlich und räumlich hoch aufgelöste Artenverzeichnisse abzielt [4]. Obwohl wiederholt über die Leistungsfähigkeit des eDNA-Ansatzes berichtet wurde [5], besteht ein großer Bedarf an einer Standardisierung der Anwendung der eDNA-basierten Bewertung der aquatischen Biodiversität ([6][7]). Es ist jedoch zu beachten, dass das eDNA-basierte Biomonitoring derzeit nicht die Möglichkeit bietet, bestimmte Populationsparameter (z. B. Individuengröße, Geschlecht) zu ermitteln, die mit herkömmlichen Probenahmeverfahren gewonnen werden können.

Dieses Dokument enthält eine Anleitung zur Gewinnung und Aufbewahrung von eDNA aus Wasserproben und behandelt damit den ersten und entscheidenden Schritt für jede weitere eDNA-basierte Analyse der biologischen Vielfalt. Ein spezifischer technischer Bericht für die routinemäßige Probenahme von benthischen Kieselalgen aus Flüssen und Seen, der für Metabarcoding-Analysen angepasst wurde, ist CEN/TR 17245:2018.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Verfahren für die Probenahme, den Fang und die Konservierung von Umwelt-DNA (eDNA) in Gewässern fest, die von Organismen stammen, die sich in einem Gewässer aufhalten oder aufgehalten haben, das Gewässer besucht haben oder deren DNA durch irgendeinen Mechanismus in das Gewässer gelangt ist. Dieses Dokument behandelt auch Verfahren zur Vermeidung von Probenkontaminationen und zur Sicherstellung der DNA-Qualität, Schlüsseleigenschaften des Filtrationsverfahrens und der Ausrüstung sowie Berichtsstandards.

Dieses Dokument befasst sich nicht mit der Gewinnung von eDNA aus Biofilmen, Sedimenten oder ähnlichen Probenarten und geht nicht auf die Gestaltung der Probenahme ein.

WARNUNG — Anwender dieses Dokuments sollten mit den Protokollen für Wasserprobenahmen zur Bewertung der biologischen Vielfalt vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsprobleme anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, geeignete Gesundheits- und Sicherheitsmaßnahmen zu treffen.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

Anmerkung 1 zum Begriff: Nicht alle unten aufgeführten Definitionen sind notwendigerweise auf alle Studien anwendbar. Es sind nur diejenigen erforderlich, die für die Ziele der jeweiligen Studie relevant sind.

3.1

Kreuzkontamination

unbeabsichtigte Übertragung einer beliebigen Quelle von und/oder DNA von einer Probe auf eine andere Probe

3.2

Dekontamination

Verfahren zur Entfernung von DNA-Quellen und/oder -Spuren aus Materialien, die mit der Probe in Kontakt kommen könnten

3.3

geschlossene Filtereinheit

Filtergerät, bei dem die Filtermembran eingekapselt ist und bei dem der Zu- und Abfluss für Transport und Lagerung verschlossen werden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Die auf dem Filter enthaltene eDNA wird in der Regel extrahiert, ohne den Filter aus der Filterkapsel zu entfernen, wodurch das Risiko einer Kontamination der Proben erheblich verringert wird.

3.4

Umwelt-DNA eDNA

Material, das z. B. von toten oder lebenden Organismen stammt und einzelsträngige (ss) und doppelsträngige (ds) DNA-Fragmente von Kern- und mitochondrialer/plastischer DNA von Eukaryoten sowie Plasmid-DNA von Prokaryoten umfasst

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Aufnahme von DNA aus verschiedenen Quellen wie einzelligen oder kleinen mehrzelligen Organismen oder Gewebepartikeln (z. B. abgestoßene Zellen, Fäkalien) und Gameten von mehrzelligen Organismen

3.5

Leerwert der Felddausrüstung

Probe, die aus der Aufbereitung von ziel-DNA-freiem Wasser durch alle verwendeten Geräte und Verfahren gewonnen wird, die an der eDNA-Probenahme beteiligt sind, um sicherzustellen, dass die Geräte und Verfahren keine Kontaminationen verursachen

3.6

geschlossene Filtereinheit

Systeme, bei denen eine Filtermembran während des Filtrationsvorgangs in einem festen Gehäuse geschützt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Filter werden zur eDNA-Extraktion aus dem Gehäuse entfernt. Das Gehäuse kann geöffnet und der Filter zur Konservierung und späteren Verarbeitung entfernt werden.

3.7

Lysispuffer

Pufferlösung zur Konservierung der in der Probe vorhandenen DNA und zum Lysieren/Aufbrechen der Zellen als erster Schritt der DNA-Extraktion

3.8

interne Positivkontrolle

IPC

bekanntes Fragment einer synthetischen DNA, das eine amplifizierbare und quantifizierbare Sequenz enthält, die in der Probe nicht natürlich vorkommt

Anmerkung 1 zum Begriff: Die IPC kann der Probe oder dem Konservierungs-/Lysepuffer in einer bekannten Konzentration zugesetzt werden, um die Effizienz der DNA-Konservierung, DNA-Extraktion, DNA-Amplifikation und DNA-Identifizierung zu überprüfen.

3.9

offene Filtereinheit

Filtrationsgerät, aus dem die Filtermembran zur weiteren Verarbeitung von Hand entfernt werden muss, einschließlich Filtrationstürme (Labor) und Filtrationsrucksäcke

3.10

Vorfilter

Filtermembran, Netz- oder Schlauchsieb mit einer größeren Porengröße als die Hauptfiltermembran (zum Auffangen der eDNA), durch die das Wasser zunächst geleitet wird, um größere Sediment-, Pflanzen- oder Algenpartikel zu entfernen und so das Wasservolumen zu vergrößern, das vor der Sättigung des Hauptfilters gefiltert werden kann

3.11

Probenkontamination

Vorgang, bei dem während der Probenahme ungewollt exogene DNA in die Probe eingebracht wird

Anmerkung 1 zum Begriff: DNA, die bereits vor der eDNA-Probenahme im Wasser vorhanden ist, gilt nicht als Kontamination

3.12

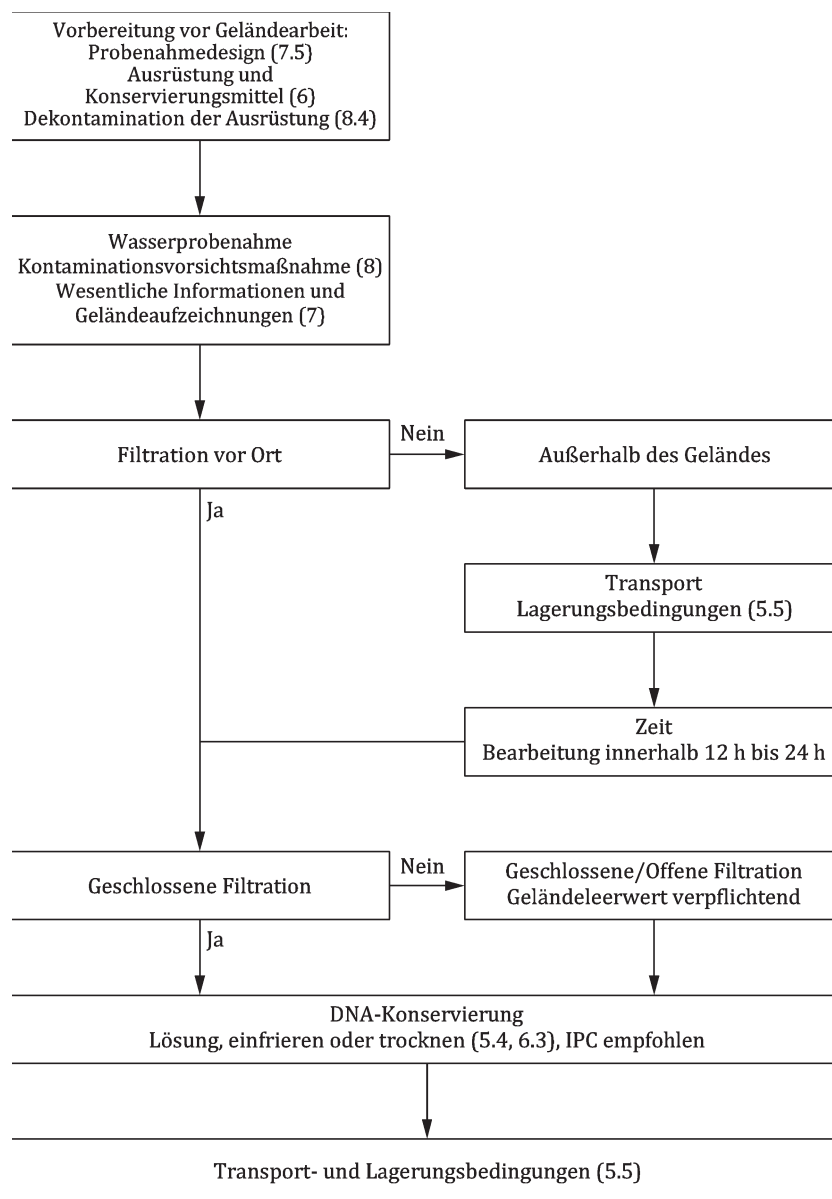
Ziel-DNA

jede Quelle und/oder Spur von DNA der untersuchten Art/Taxa

4 Grundlagen

Eine repräsentative Wasserprobe aus dem untersuchten Wasserkörper wird nach einem geeigneten Probenahmeplan entnommen, um eDNA aus der Wasserprobe zu gewinnen und abzutrennen. Während des gesamten Verfahrens wird eine (Kreuz-)Probenkontamination mit Ziel-DNA vermieden und die Integrität der eDNA sichergestellt.

Bild 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Schritte und Überlegungen für die eDNA-Wasserprobenahme.



ANMERKUNG Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf den jeweiligen Abschnitt/Unterabschnitt.

Bild 1 — Wichtige Schritte und Überlegungen für die eDNA-Wasserprobenahme

5 Allgemeines Verfahren

5.1 Allgemein

Es muss Wasser gesammelt werden, um eDNA durch Filtration oder andere Verfahren aufzufangen und abzutrennen. Die Wahrscheinlichkeit, eDNA von dem/den Zielorganismus(en) zu gewinnen, ist positiv korreliert mit

- der Anzahl der Proben je Wasserkörper,
- der räumlichen Repräsentativität der Proben,
- dem Volumen des gefilterten Wassers, und
- dem optimalen Zeitpunkt der Probenahme bzw. der optimalen Jahreszeit im Hinblick auf die eDNA-Ausscheidungsraten, die Häufigkeit, die Stoffwechselaktivität und die Fortbewegung des Organismus/der Organismen.

5.2 Probenahme

Je nach den verschiedenen Anwendungen/Zielen jeder eDNA-Erhebung sind die am besten geeigneten Probenahmebedingungen und das Design von Fall zu Fall zu bewerten, um Wasserproben zu erhalten, die repräsentativ für den Wasserkörper und die zu überwachenden Organismen sind. Dazu könnten hydrologische, meteorologische, saisonale/zeitliche und biologische/ökologische Schwankungen gehören.

Dies ist besonders wichtig bei lentischen (nicht fließenden) Gewässern, da die eDNA oft ungleichmäßig verteilt ist, wenn das Wasser nicht gut gemischt ist. Repräsentative Probenahmen können durch die Zusammenführung von Teilproben, die an verschiedenen Stellen des Wasserkörpers entnommen wurden, oder alternativ durch kontinuierliche Probenahmesysteme, die sich durch den Wasserkörper bewegen und dabei Wasser ansaugen, erreicht werden. Bei der Untersuchung tiefer Gewässer und bei der Suche nach Organismen, die in tiefen Gewässern leben, kann es erforderlich sein, Wasser aus der Tiefe zu entnehmen.

Um die Wahrscheinlichkeit des Erfassens der Ziel-DNA zu maximieren, ist bei der Planung, wo und wann Proben und Teilproben zu entnehmen sind, Folgendes zu berücksichtigen:

- 1) Merkmale des Gewässers, einschließlich seiner Größe, Tiefe, Strömung und der Verteilung von Mikrohabitaten sowie der Zu- und Abflüsse des Gewässers.
- 2) Biologie aller Zieltaxa, einschließlich Habitatpräferenzen und Lebenszyklus. Die Nachweiswahrscheinlichkeit für einzelne Arten kann erhöht werden, indem die Probenahme zeitlich so gelegt wird, dass sie mit Zeiten intensiver Aktivität (z. B. Laichzeit) zusammenfällt. Es ist auch wichtig zu berücksichtigen, ob sich die Zieltaxa zum Zeitpunkt der Probenahme wahrscheinlich im Wasserkörper aufhalten, insbesondere im Fall von amphibischen oder wandernden Arten.

5.3 Vorbereitung der Ausrüstung vor der Feldarbeit

Vor der Feldarbeit müssen die Sammelgefäße und die Ausrüstung gereinigt werden, um eine Kontamination zu vermeiden (ausführliche Anweisungen siehe 8.4).

5.4 Auffangen des Wassers und Gewinnung der eDNA

Für das Sammeln und Filtern von Wasser werden verschiedene Systeme verwendet. Bei einigen wird das Wasser zunächst in einem Sammelbehälter gesammelt, wo es gemischt und dann am Ufer gefiltert wird; bei anderen Systemen wird das Wasser direkt gefiltert, während es aus dem Gewässer entnommen wird. Wenn das Wasser nicht direkt im Gewässer gefiltert wird, kann die Filtration am Ufer oder im Labor durchgeführt werden.