

VEREIN
DEUTSCHER
INGENIEURE

Monitoring der Wirkungen gentechnisch veränderter
Organismen (GVO)

Verfahren zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Böden
zur Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften und
zum Nachweis transgener DNA

Qualitätsanforderungen und Anwendungsbeispiele

Monitoring the effects of genetically modified
organisms (GMOs)

Method for extracting nucleic acids from soil for the
analysis of microbial communities and for detection
of transgenic DNA

Quality requirements and applications

VDI 4331
Blatt 2 / Part 2

Ausg. deutsch/englisch
Issue German/English

Die deutsche Version dieser Richtlinie ist verbindlich.

The German version of this standard shall be taken as authoritative. No guarantee can be given with respect to the English translation.

Inhalt	Seite	Contents	Page
Vorbemerkung	2	Preliminary note.....	2
Einleitung.....	2	Introduction.....	2
1 Anwendungsbereich	7	1 Scope	7
2 Normative Verweise	8	2 Normative references	8
3 Begriffe	9	3 Terms and definitions	9
4 Qualitätsanforderungen für Nukleinsäureextrakte	10	4 Quality requirements for nucleic acid extracts	10
5 Materialliste	12	5 List of materials	12
5.1 Geräte und Ausrüstung.....	12	5.1 Apparatuses, instruments, equipments.....	12
5.2 Reagenzien.....	12	5.2 Reagents.....	12
6 Durchführung	13	6 Procedure	13
6.1 Probenahme.....	13	6.1 Sampling.....	13
6.2 Transport, Aufarbeitung und Lagerung der Proben.....	13	6.2 Transportation, preparation and storage of samples.....	13
6.3 Extraktion von Nukleinsäuren aus Bodenproben.....	14	6.3 Extraction of nucleic acids from soil samples.....	14
6.4 Qualitätsanalysen der Nukleinsäuren.....	17	6.4 Quality assessment.....	17
6.5 Molekularbiologische Analysen und ihre Nachweisgrenzen.....	18	6.5 Molecular-biological analysis techniques and their detection limits.....	18
Anhang A DNA-Extraktion aus Bodenproben	20	Annex A Protocol for DNA extraction from soil samples.....	20
Anhang B Spezielle Anpassung für die DNA-Extraktion aus Böden mit hohem Huminstoffgehalt	23	Annex B Special modification of a protocol for DNA extraction from soils with a higher amount of humic material	23
Anhang C Gleichzeitige Extraktion von DNA und RNA aus Bodenproben.....	24	Annex C Protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soil samples.....	24
Schrifttum	27	Bibliography	27

VDI-Gesellschaft Technologies of Life Sciences (TLS)

Fachbereich Gentechnik

VDI-Handbuch GVO-Monitoring

Vorbemerkung

Der Inhalt dieser Richtlinie ist entstanden unter Beachtung der Vorgaben und Empfehlungen der Richtlinie VDI 1000.

Alle Rechte, insbesondere die des Nachdrucks, der Fotokopie, der elektronischen Verwendung und der Übersetzung, jeweils auszugsweise oder vollständig, sind vorbehalten.

Die Nutzung dieser VDI-Richtlinie ist unter Wahrung des Urheberrechts und unter Beachtung der Lizenzbedingungen (www.vdi.de/richtlinien), die in den VDI-Merkblättern geregelt sind, möglich.

Allen, die ehrenamtlich an der Erarbeitung dieser VDI-Richtlinie mitgewirkt haben, sei gedankt.

Eine Liste der aktuell verfügbaren Blätter dieser Richtlinienreihe ist im Internet abrufbar unter www.vdi.de/4331.

Einleitung

Böden sind typischerweise durch eine große Vielfalt unterschiedlicher Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen, Pilze, Protozoen) gekennzeichnet. Mikrobielle Gemeinschaften liefern durch ihre Stoffwechselaktivitäten einen wichtigen Beitrag zu ökosystemaren Funktionen und zur nachhaltigen Nutzung von Böden. Außerdem sind sie für Pflanzenwachstum und -gesundheit von großer Bedeutung. In ihrer Zusammensetzung reagieren mikrobielle Gemeinschaften auf verschiedene abiotische und biotische Umweltfaktoren, wodurch sich Änderungen in ihren Funktionen ergeben können. Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaften können daher unter Umständen auch ökologische und ökonomische Schäden herbeiführen. Diese können auf der Ebene von biogeochemischen Kreisläufen liegen (z.B. durch erhöhte Emissionen von Treibhausgasen, wie Methan oder Stickoxiden) oder in der Anreicherung von pflanzen-, tier- und humanpathogenen Mikroorganismen bestehen.

Da eine Veränderung *per se* nicht als negativ gewertet werden kann, müssen mögliche Effekte von definierten Einflussfaktoren (z.B. gentechnisch veränderten Organismen (GVO), Bodenbearbeitungen, Pflanzenschutzmitteln, organischen Schadstoffen, Schwermetallen) auf die mikrobielle Gemeinschaft von ihrer natürlichen Dynamik abgegrenzt werden. Ebenso kann das Ausmaß einer Veränderung in der Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft nicht direkt mit dem Ausmaß eines Schadens korreliert werden, da natürliche Schwankungen, z.B. im Wassergehalt eines Bodens oder durch die kurzfristige Verfügbarkeit von Nährstoffen, z.B. nach einer Düngung, erhebliche Verschiebungen der mikrobiellen Vielfalt hervorrufen

Preliminary note

The content of this standard has been developed in strict accordance with the requirements and recommendations of the standard VDI 1000.

All rights are reserved, including those of reprinting, reproduction (photocopying, micro copying), storage in data processing systems and translation, either of the full text or of extracts.

The use of this standard without infringement of copyright is permitted subject to the licensing conditions specified in the VDI Notices (www.vdi.de/richtlinien).

We wish to express our gratitude to all honorary contributors to this standard.

A catalogue of all available parts of this series of standards can be accessed on the internet at www.vdi.de/4331.

Introduction

Soil typically contains a high diversity of microorganisms (bacteria, archaea, fungi, protozoa). Such microbial communities make a significant contribution to ecosystem processes and sustainable soil use through their metabolic activities. They are also very important for plant growth and health. Microbial communities can change their composition in response to various abiotic and biotic environmental factors, which may also result in functional changes. In some circumstances, changes to microbial communities may also result in ecological and economic damage. This may occur at the level of biogeochemical cycles (e.g. due to increased emissions of greenhouse gases such as methane or nitrogen oxides) or by increasing the presence of plant, animal and human pathogens.

Since a change in the microbial community structure cannot be interpreted as negative *per se*, the possible effects of defined triggers (e.g. genetically modified organisms (GMOs), soil cultivation, pesticides, organic pollutants, heavy metals) must be seen in relation to their natural dynamics. Equally, the extent of change in the composition of a microbial community does not directly translate to the degree of damage, since natural fluctuations, e.g., in the water content of the soil or due to the short-term availability of nutrients after fertilizing, can cause significant fluctuations in microbial diversity. The persistence of changes in microbial diversity (e.g., over a period of several years) provides a much better indicator of damage. Variabil-

können. Zur Schadensindikation ist vielmehr das Andauern einer Veränderung der mikrobiellen Vielfalt z.B. über einen mehrjährigen Zeitraum zu berücksichtigen. Die Veränderlichkeit in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft hat auch Konsequenzen für die Probenahme, z.B. sollten Bodenproben nicht unmittelbar nach Düngungsereignissen genommen werden (Abschnitt 6.1 und Abschnitt 6.2).

Im Rahmen dieser VDI-Richtlinie werden Grundprinzipien erläutert und Beispielprotokolle zur Extraktion von Nucleinsäuren aus Böden gegeben. Nucleinsäuren beinhalten DNA und RNA. Beispiele für Protokolle, mit denen entweder DNA oder kombiniert DNA und RNA aus Bodenproben extrahiert und gereinigt werden können, werden im Anhang zu dieser Richtlinie gegeben. Diese Richtlinie spezifiziert nicht die nach Extraktion und Reinigung folgenden analytischen Methoden zur qualitativen oder quantitativen Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften oder Nachweisen von Transgenen aus GVO im Detail (z.B. PCR-Primer und PCR-Bedingungen, siehe hierzu VDI 4330 Blatt 7). Derartige Informationen zu spezifischen Anwendungen sollten der aktuellen Literatur entnommen werden. Möglicherweise sind jedoch auch das Design neuer Primer sowie die Anpassung der PCR-Bedingungen notwendig.

Protokolle zur Extraktion von Nucleinsäuren aus Bodenproben wurden erstmals Ende der 1980er-Jahre publiziert und werden seitdem zunehmend in Forschungslaboratorien eingesetzt. Extrahierte Nucleinsäuren stammen im Wesentlichen aus Bodenmikroorganismen, können aber auch pflanzlichen – oder, in einem geringeren Maß – tierischen Ursprungs sein. Die Nucleinsäuren dienen als Ausgangsmaterial zum Nachweis von Mikroorganismen und zur Ermittlung ihrer Vielfalt. Zusätzlich können die Nucleinsäuren auch zum Nachweis pflanzlicher Gene genutzt werden, um z.B. transgene DNA (rekombinante Gene) aus gentechnisch veränderten Pflanzen zu detektieren, z.B. aus deren Wurzeln oder Blatt- und Stängelresten im Boden. Die Nachweise der jeweiligen Zielgene, sei es für die Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt oder für den GVO-Nachweis, erfolgt dabei vor allem mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus den bodenextrahierten Nucleinsäuren. Aktuelle Forschungsarbeiten in diesem Gebiet führen dazu, dass ständig neue, verbesserte Nachweisverfahren für bestimmte Zielgene publiziert werden. Daher wird empfohlen, die aktuelle Literatur für die Auswahl eines spezifischen Nachweisverfahrens unbedingt zu überprüfen, um z.B. geeignete Primer für die PCR oder Gensonden

ity in the composition of microbial communities has also practical consequences when it comes to developing soil sampling strategies, e.g., soil samples should not be taken immediately after soil fertilization (Section 6.1 and Section 6.2).

This VDI Standard explains the basic principles and provides sample protocols for the extraction of nucleic acids from soil. Nucleic acids include DNA and RNA. Examples for protocols for extracting either DNA or combined DNA and RNA are given in the Annex of this document. This VDI Standard does not specify subsequent detection methods (e.g. PCR primers and conditions, for this purpose see VDI 4330 Part 7) to quantitatively and qualitatively characterize microbial communities or detect recombinant genes (transgenes) of GMOs from soil. Information on such specific purposes should be taken from the relevant literature or, if not available, require the development of new primers and adapted protocols, for which recommendations would go beyond the scope of this standard.

Protocols for nucleic acid extractions from soil were first published in the late 1980s and have since been used increasingly in research laboratories. Nucleic acids extracted from soil are largely derived from microbial cells, but they may also originate from plant material or, to a lower extent, animal residues. Soil nucleic acids provide the source material for detecting microorganisms and determining their diversity but they can also be used to detect genes from plant root cells or plant residues, for example transgenic DNA (recombinant genes) from genetically modified plants. For the purposes of detecting specific target genes, either to characterise microbial diversity or detect transgenes from GMOs, the nucleic acids extractions from soil focus on DNA which is then typically subjected to polymerase chain reactions (PCR) for amplification of target genes. Ongoing research in this field frequently updates and improves existing detection systems and therefore, studies on specific target genes should always consider the most recent literature for designing the appropriate analytical tools, i.e. primers or Taqman probes (see Section 6.5).

(Taqman-Sonden für die qPCR, siehe Abschnitt 6.5) auszuwählen.

Kultivierungsunabhängige Verfahren zur Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt aus Bodenproben sind in jedem Fall den klassischen Verfahren vorzuziehen, die sich durch Anreicherung von Mikroorganismen auf Nährböden auszeichnen. Nur ein geringer Anteil der Bodenmikroorganismen, häufig weniger als 1 %, ist zum Wachstum unter herkömmlichen Laborbedingungen befähigt. Die großen Potenziale der kultivierungsunabhängigen Nachweismethoden zeigen jedoch auch deutlich die allgemeinen Limitierungen, wenn es um die Ermittlung der tatsächlichen mikrobiellen Vielfalt in Böden geht. Die natürliche Vielfalt einer mikrobiellen Gemeinschaft im Boden ist so groß, dass sie mit einer praktikablen Monitoring-Methode bis heute nicht – z.B. nicht einmal aus einem Gramm Boden – vollständig erfasst werden kann. Insbesondere der Nachweis von Mikroorganismen, die nicht zu den dominanten Populationen gehören, ist problematisch und bleibt eine methodische Herausforderung. Vielversprechend für den Nachweis dieser seltenen Mikroorganismen einer Gemeinschaft sind neue Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungsverfahren [11]. Im Rahmen dieser Richtlinie werden Verfahren vorgestellt, die es ermöglichen, die dominanten Bodenmikroorganismen sowie ausgewählte phylogenetische, also eng verwandte Gruppen, zu erfassen (Abschnitt 6.5). Eine weitere für die Dateninterpretation zu berücksichtigende Limitierung besteht darin, dass die aus einem Boden extrahierten Nukleinsäuren, insbesondere die DNA, auch aus ruhenden oder bereits abgestorbenen Zellen stammen können und somit ein Nachweis bestimmter Organismen aus einer Bodenprobe nicht automatisch einen Hinweis auf ihre In-situ-Aktivität ist. Außerdem bedeutet der Nachweis von Genen auf DNA-Ebene nicht unbedingt, dass diese Gene unter den gegebenen Bedingungen des Bodens auch „angeschaltet“ sind, das heißt, der Nachweis eines Gens ist noch kein Nachweis seiner Aktivität.

Da die aus Boden extrahierte DNA im Prinzip die gesamte genetische Information der mikrobiellen Gemeinschaften beinhalten, kann mithilfe der PCR, unter der Voraussetzung, dass geeignete Primer zur Verfügung stehen, jedes beliebige Gen aus diesem genetischen Pool (dem Bodenmetagenom) nachgewiesen werden. Derartige Gene können als Indikatoren für die strukturelle oder funktionelle Vielfalt dienen. Die am häufigsten für die Untersuchung der strukturellen Vielfalt eingesetzten Zielgene, insbesondere für Bakteriengemeinschaften, sind die SSU-rRNA-Gene, die für die

Cultivation-independent approaches for characterizing microbial diversity from soil samples are always preferred to classic methods in which microorganisms are grown in or on cultivation media in the laboratory. Only a minor fraction of soil microorganisms, typically less than 1 %, is capable of growing under commonly applied conditions for cultivation. However, the significant potential of cultivation-independent detection methods also causes problems when the aim is to determine the total microbial diversity in the soil. The natural diversity of soil microbial communities is, in fact, so huge that no practical monitoring method has yet been devised to allow their complete determination, even from a single gram of soil. The detection of microorganisms which do not contribute to the dominant population is particularly problematic and remains a methodological challenge, which is now tackled by novel high-throughput DNA sequencing technologies [11]. This standard indicates methods, outside of the new sequencing technologies, which can be applied for the detection of dominant soil microorganisms and selected phylogenetic (closely related) groups (Section 6.5). A further limitation of nucleic acid analyses extracted from soil, which must be kept in mind when interpreting data, is that the nucleic acids, especially DNA, may also be derived from resting cells or dead cells in which the nucleic acids have not yet been fully mineralized. Furthermore, genes encoding for a certain function, may not be actively transcribed under certain environmental conditions. Thus, detection of specific genes from an organism in a soil sample does not automatically indicate its *in situ* activity. Moreover the detection of genes on DNA basis does not necessarily mean that these genes are expressed under soil conditions, i.e. the detection of a gene is no proof of its activity.

Since the DNA extracted from the soil basically contains the complete genetic information of the microbial communities, any gene from this genetic pool, i.e., the soil metagenome, can be detected by PCR analysis, given that appropriate detection systems (primers) are available. Such genes can be used as indicators of structural and functional diversity. SSU rRNA genes, encoding RNA for ribosomes, are the most commonly used target genes for investigating structural diversity of microbial, especially bacterial communities. Ribosomes are found in all living organisms, as they are an essen-

ribosomale RNA als Baustein von Ribosomen kodieren. Ribosomen kommen in allen lebenden Organismen vor. Sie bilden einen unverzichtbaren Bestandteil des zellulären Proteinsynthese-Apparats. Die SSU-rRNA-Gene aus verschiedenen Organismen zeigen eine relativ große Ähnlichkeit zueinander, und der Vergleich der Gene mit Sequenzdaten bereits sequenzierter Mikroorganismen gibt Aufschluss über ihre Verwandtschaft auf stammesgeschichtlicher (phylogenetischer) Ebene. Für Bakterien sind z.B. bis heute mehr als drei Millionen rRNA-Gene beschrieben, die in öffentlichen Datenbanken für Vergleichsuntersuchungen zur Verfügung stehen [1; 2]. Für die Charakterisierung der Vielfalt von Bodenpilzen wird häufig die ITS-Region, ein nicht funktioneller Abschnitt des rRNA-Operons genutzt, da sich diese Region bei verschiedenen Pilzen stärker unterscheidet als die rRNA-Gene selbst. Damit ist eine genauere Zuordnung möglich [3]. Während sich aus der extrahierten Boden-DNA theoretisch alle vorhandenen Organismen nachweisen lassen, ermöglicht die Analyse von RNA-Extrakten bevorzugt den Nachweis stoffwechselaktiver und wachsender Organismen, die in der Regel aufgrund einer höheren Proteinsyntheserate deutlich mehr Ribosomen (und damit rRNA) in ihren Zellen enthalten als inaktive Organismen.

Ziel dieser Richtlinie ist es, die besonderen Anforderungen an Verfahren zur Extraktion von Bodennukleinsäuren für eine nachfolgende PCR oder reverse Transkriptase (RT)-PCR basierende Analytik herauszustellen (siehe Abschnitt 2). Auf die Bedeutung des Probenahmezeitpunkts wurde bereits hingewiesen (siehe oben). Außerdem ist eine einheitliche Probenaufbereitung und Lagerung für Qualität und Quantität der extrahierten Nukleinsäuren und damit auch für die Ergebnisse der weiteren molekularen Untersuchungen von großer Bedeutung. Weitere kritische Schritte beziehen sich auf den mikrobiellen Zellaufschluss und die Reinigung der Nukleinsäuren. Aufgrund der komplexen Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung der Bodennukleinsäuren, die neben DNA auch RNA beinhalten können (Abschnitt 6.3 und Abschnitt 6.4), ist es von zentraler Bedeutung, dass die Verfahren die Nukleinsäuren so wenig wie möglich zerstören. Fragmentierungen der DNA sind aufgrund des makromolekularen Aufbaus unvermeidbar, jedoch sollten Mindestanforderungen an die DNA-Fragmentgrößen beachtet werden.

Die Richtlinie bezieht sich in erster Linie auf die Untersuchung typischer landwirtschaftlich genutzter Böden, wie sie in Deutschland und vergleichbaren klimatischen Regionen in Europa vorkommen.

tial component for protein biosynthesis. Since SSU rRNA genes from different organisms are largely similar, comparison of the genes with sequence data from microorganisms that have already been sequenced provides an indication of their phylogenetic affiliation. For bacteria, for example, more than three million rRNA genes were sequenced to date. These are available in public databases for comparative studies [1; 2]. To characterize the diversity of soil fungi it is common practice to use the ITS region, a functional inactive section of the rRNA operon, since within fungi this ITS region differs more strongly than the SSU rRNA genes and thus an accurate classification is possible [3]. Whilst in theory it is possible to detect the presence of any organism from the DNA extracted from soil, analysis of RNA extracts is the preferred method for detecting metabolically active and growing organisms. The cells of these organisms generally (but not always) contain significantly more ribosomes (and therefore rRNA) than those of inactive organisms.

This standard aims at describing the particular requirements of methods for extracting soil nucleic acids for subsequent PCR or reverse transcriptase (RT)-PCR analysis (for RT-PCR see also Section 2). The importance of choosing the right sampling time has already been mentioned above. Consistent sample preparation and storage also has considerable consequences on the quality and quantity of the extracted nucleic acids and the results of their subsequent analyses. Microbial cell disruption and nucleic acid purification are also critical steps. Due to the complex range of applications associated with investigating soil nucleic acids, some of which may involve RNA as well as DNA (Section 6.3 and Section 6.4), it is essential to ensure that the methods cause minimum damage to the nucleic acids. Fragmentation of the DNA is unavoidable due to its macromolecular structure, but there are minimum requirements for the length of DNA fragments.

The standard gives priority to the analysis of typical agricultural soil as found in Germany and comparable climatic zones in Europe. It does not provide a detailed consideration of adjustments re-

Sie berücksichtigt im Detail nicht die Extraktion aus Böden oder Bodenkompartimenten mit einem sehr hohen Anteil an organischem Kohlenstoff (z.B. Streuschicht von Waldböden, einer besonders niedrigen Biomasse (z.B. tieferen Bodenhorizonten), hohen Salzgehalten, extremen pH-Werten oder hohen Gehalten an Schwermetallen. Auch aus derartigen Böden können Nukleinsäuren extrahiert werden, jedoch erfordert der Anspruch an eine hinreichende Ausbeute und Qualität besondere methodische Anpassungen, auf die hier nicht eingegangen wird.

Zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Bodenproben sind prinzipiell zwei methodische Alternativen anwendbar: Die **direkte Extraktion** und die **Zell-extraktion**. Bei der direkten Extraktion werden die Zellen der Mikroorganismen zur Freisetzung ihrer Nukleinsäuren bereits direkt in der Bodenmatrix aufgeschlossen (lysiert), wobei die Nukleinsäuren anschließend von den übrigen Huminstoffen zu reinigen sind, insbesondere von den Huminsäuren, die störende Einflüsse auf nachfolgende molekulare Nachweismethoden haben [4]. Bei der Zellextraktion werden zunächst die Mikroorganismenzellen vom Bodenmaterial abgelöst, insbesondere über Zentrifugationsschritte, und erst danach die Nukleinsäuren extrahiert.

Diese Richtlinie gibt vor, dass bei Untersuchungen von Bodenproben die direkte Extraktion aufgrund ihrer hohen Ausbeute, Reproduzierbarkeit und Praktikabilität vorzuziehen ist. Eine Ausnahme bilden Untersuchungen von pflanzenwurzelassoziierten Bodenmikroorganismen (Rhizosphäre). Hier empfiehlt es sich, die Mikroorganismen zunächst durch mechanische Behandlung der in Wasser oder Puffern resuspendierten Wurzeln mit anhaftendem Boden abzulösen und vor der Nukleinsäureextraktion durch Zentrifugation als Mikroorganismenpellet zu sammeln, da anderenfalls große Teile pflanzlicher Nukleinsäuren (insbesondere mitochondriale DNA) die Ergebnisse der Untersuchungen verfälschen können. Auch bei Untersuchungen von Böden, die Schwermetalle enthalten, ist die Zellextraktionsmethode vorzuziehen um die anschließende PCR-Analytik wegen Hemmungen der DNA-Polymerasen durch Schwermetalle nicht zu behindern [5].

Abschließend wird darauf hingewiesen, dass für die Extraktion von Bodennukleinsäuren eine Reihe von kommerziellen Aufarbeitungs-Kits mit entsprechenden Protokollen zur Verfügung steht. Im Bereich der angewandten Forschung und Analyse haben diese die herkömmlichen Protokolle, die auf selbst hergestellte Lösungen zurückgreifen, praktisch vollständig verdrängt. Um dem Anspruch der

required for extraction of nucleic acids from soils or soil compartments containing particularly high levels of organic carbon (e.g. litter layer on forest floors), particularly low biomass (e.g. lower soil horizons), high salt levels, extreme pH values or high amounts of heavy metals. Nucleic acids may well be extracted from these types of soil, however, the need of sufficient yield and quality requires special methodological adaptations which are not described.

For extracting nucleic acids from soil, two different methodological approaches can be distinguished: **direct extraction** and **cell extraction**. Applying direct extraction, the microbial cells are disrupted (lysed) directly in the soil matrix to release their nucleic acids. The nucleic acids are subsequently purified to remove residual soil substances, particularly humic acids, which interfere with subsequent molecular detection methods [4]. Applying cell extraction the microbial cells are separated, typically by centrifugation(s), from the other soil constituents before the nucleic acids are extracted.

This standard recommends the direct extraction method for analysing soil samples because it produces higher yields and is more practical as well as reliable. Analyses of soil microorganisms associated with plant roots (rhizosphere) are an exception. In this case we recommend removing the microorganisms by resuspending the roots with adherent soil in water or buffers and pelletizing the microorganisms by centrifugation prior to extracting the nucleic acids to avoid interference with plant nucleic acids (particularly mitochondrial DNA). Cell extraction is also the preferred option for analysing soils with heavy metals to avoid inhibition of the subsequent PCR analysis by interference of coextracted heavy metals with DNA polymerases [5].

For the practical side, it should be noted that a range of soil nucleic acid extraction and purification kits with corresponding protocols are commercially available. In the field of applied research and analysis, these kits have almost entirely replaced conventional protocols using in-house solutions for extraction and purification. To address the need for practical feasibility, this standard will

Praxistauglichkeit zu genügen, werden daher in dieser Richtlinie insbesondere derartige Kits zur Extraktion und Reinigung von Bodennukleinsäuren berücksichtigt. Dem Anwender wird empfohlen, sich unabhängig von den in den hier beschriebenen Protokollen genutzten Kits einen aktuellen Marktüberblick zu verschaffen, um das für die vorgegebenen Untersuchungsziele beste Produkt identifizieren zu können.

1 Anwendungsbereich

Die Richtlinie beschreibt Qualitätsanforderungen an die Untersuchung von landwirtschaftlich genutzten Böden, um die direkten oder indirekten Wirkungen einer Freisetzung oder eines Anbaus von GVO auf Struktur und Funktion oder funktionelle Potenziale mikrobieller Gemeinschaften zu erfassen. Darüber hinaus kann unter der Voraussetzung einer optimalen Extraktions- und Nachweismethode die durch GVO in Böden eingetragene transgene DNA (mit rekombinanten Genen) qualitativ oder quantitativ nachgewiesen werden (siehe hierzu VDI 4330 Blatt 7).

Die beschriebenen Methoden dienen der kultivierungsunabhängigen Analyse mikrobieller Gemeinschaften. Durch geeignete Extraktionsverfahren sollen die zu untersuchenden Nukleinsäuren in möglichst hochmolekularer Form aus unterschiedlichen Böden isoliert und von Begleitsubstanzen gereinigt werden, die eine nachfolgende molekularbiologische Analyse hemmen können. Extraktionsverfahren müssen gegebenenfalls den spezifischen Eigenschaften eines Bodens angepasst werden. Die Definition eines Standardprotokolls für die Extraktion von DNA oder DNA/RNA aus Boden erscheint nicht sinnvoll, denn oftmals variieren in Abhängigkeit von den Bodeneigenschaften die Ausbeute der extrahierten Nukleinsäuren, deren Molekulargewicht und die Konzentration mitextrahierter Bodeninhaltsstoffe. Diese Richtlinie beschreibt daher den modularen Aufbau von Extraktions- und Reinigungsprotokollen in Abhängigkeit von der spezifischen Eigenschaft eines Bodens und gibt im Anhang Beispiele für Extraktionsprotokolle. Weiterhin ist es die Intention dieser Richtlinie, für kritische Parameter der Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren aus Böden Lösungsvorschläge zu liefern.

Bei der **direkten Extraktion** von Nukleinsäuren werden die mikrobiellen Zellen bereits in der Bodenmatrix aufgebrochen (lysiert), um dann die Nukleinsäuren insgesamt zu extrahieren. Dabei werden sowohl die mikrobielle zelluläre DNA und RNA als auch in einem gewissen Umfang zellfreie DNA extrahiert, beispielsweise solche aus Pflan-

therefore focus on utilizing such commercial kits. Regardless of the kits used in the protocols described here, the user should first gain an overview about products on the market to identify the best for the particular analytical requirements.

1 Scope

This standard describes the quality requirements for the analysis of agricultural soils in order to determine the direct or indirect effects of the release or cultivation of GMOs on the structure and function or functional potentials of microbial communities. Given an optimum extraction and detection system, the nucleic acids can be used to detect transgenic DNA (recombinant genes) introduced into soil through GMOs or their residues by qualitative or quantitative means (for this purpose see VDI 4330 Part 7).

The methods described relate to the cultivation-independent analysis of microbial communities. The aim is to isolate the nucleic acids with the highest possible molecular weight from different soils using suitable extraction methods and to purify them by removing any accompanying substances, which could impede subsequently applied molecular detection methods. Extraction methods must be adapted to the specific characteristics of the soil if necessary. It would not be particularly helpful in the context of this standard to define one standard protocol for the extraction of DNA and/or RNA from soil, since the yield of extracted nucleic acids, their molecular weight and the concentration of co-extracted soil components often vary depending on the soil characteristics. Therefore this standard describes the extraction and purification steps in a modular structure and, in the Annex, gives examples of protocols to extract DNA/RNA from soils. It is further intended to give specific advice when dealing with critical extraction and purification parameters.

Direct extraction methods are recommended in this standard for extraction of nucleic acids from soil matrices. This approach automatically includes to a certain extent the extraction of microbial cellular DNA and RNA as well as extracellular cell-free DNA, including those originating from plant debris. It should be noted that cell-free DNA has a

zenresten. Dabei muss angemerkt werden, dass zellfreie DNA eine hohe Affinität zur Bindung (Sorption) an Oberflächen von Bodenbestandteilen, insbesondere Ton, besitzt. Daher erfolgt die Extraktion der zellfreien DNA aufgrund dieser starken Bindung möglicherweise nicht quantitativ.

Die Methode der **Zellextraktion** wird empfohlen, um mikrobielle Gemeinschaften in der Rhizosphäre (vgl. Einleitung) auf Grundlage ihrer SSU-rRNA-Gene zu untersuchen. Hierbei wird zunächst die mikrobielle Fraktion durch Zentrifugation gewonnen, um anschließend die Nukleinsäuren zu extrahieren. Dadurch lässt sich eine Verunreinigung mit pflanzlichen Plastiden oder Mitochondrien, die auch SSU-rRNA-Gene enthalten, weitgehend vermeiden. Auch andere Gene aus Bakterien der Rhizosphäre können gut mit der direkten Extraktionsmethode nachgewiesen werden.

high affinity to be sorbed by particle-active surfaces in soil, particularly clay minerals and extraction of DNA from such compartments may not be quantitative.

Cell extraction is recommended to investigate microbial communities from the rhizosphere (see also introduction) on the basis of their SSU rRNA genes. The microbial fraction is first obtained through centrifugation and subsequently used for nucleic acid extraction. This approach largely prevents contamination with plant plastids or mitochondria, which also contain SSU rRNA genes. Other bacterial genes from the rhizosphere can also be detected from directly extracted DNA.